

INFORMATIONELLE SUPPRESSION BEI DROSOPHILA:
ENTWICKLUNG UND RESULTATE EINES «IN VIVO»
TESTSYSTEMS, BASIEREND AUF DER XENOPUS OOCYTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II

von
MARIANN BIENZ
aus Winterthur

Begutachtet von den Herren
PD Dr. E. Kubli
und
Prof. Dr. P.S. Chen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1981



INFORMATIONELLE SUPPRESSION BEI DROSOPHILA:
ENTWICKLUNG UND RESULTATE EINES «IN VIVO»
TESTSYSTEMS, BASIEREND AUF DER XENOPUS OOCYTE

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der Philosophischen Fakultät II

von
MARIANN BIENZ
aus Winterthur

Begutachtet von den Herren
PD Dr. E. Kubli
und
Prof. Dr. P.S. Chen

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1981



PD Dr. E.Kubli möchte ich ganz herzlich danken für seinen Elan und seine Begeisterung, mit der er diese Arbeit leitete und förderte, Prof. P.S.Chen für seine fortwährende Unterstützung. Esther Züblin, Thomas Schmidt, Martin Altwegg und Röbi Dudler gilt mein Dank für ihre Mitarbeit und aufbauende Kritik, Annelies Payer für ihre Mithilfe.

Im weiteren möchte ich Dr. J.E.Celis danken, dass er mir für ein Teilprojekt dieser Arbeit sein Labor und seine Mithilfe in Århus zur Verfügung gestellt hat, Keld Kaltoft besonders für sein Interesse und seine Zusammenarbeit, EMBO dafür, dass sie diesen Aufenthalt finanziell unterstützt haben. Ebenso möchte ich Dr. R.Flury danken, dass ich ein weiteres Teilprojekt in seinem Labor in Bern durchführen durfte. Für ihr Interesse und ihre Zusammenarbeit danke ich Prof. G.Schubiger, Dr. J.C. Perriard, Dr. J.Kohli und ganz besonders Dr. H.Grosjean, der zu wesentlichen Teilen dieser Arbeit angeregt hat.

Ferner möchte ich für erhaltenes Forschungsmaterial danken: Dr. S.Nagata, Werner Boll, Jürg Schmid, Armin Kressmann, Dr. J.D.Smith, Dr. P.J.G.Butler, Dr. G.Keith, Dr. H.Hosbach, Dr. G.Marbaix, Dr. G.Huez, Suzy deHenau; für ihre technische Mithilfe: Herrn G.Fass, R.Sulzer, G.Wegmann und Frl. M.Eich; für ihren beratenden Beitrag: Dr. H.Briegel, Dr. G.Schüpbach, Dr. A.Dübendorfer und Prof. R.Nöthiger.

Meinen Eltern und meiner Schwester Brigitta gehört mein Dank für ihre immerwährende Unterstützung und ihr Interesse während meines Studiums.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507219_0023

INHALTSVERZEICHNIS

EINFUEHRUNG	1
RESULTATE	7
A Analyse von tRNA und ribosomalen Proteinen mittels zweidimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese	7
1. Ribosomale Proteine	7
2. Transfer RNA	7
B Suche nach tRNA Nonsensesuppressoren	18
1. Vorfraktionierungen der tRNA	18
2. Ochre Suppression in Maus Myelomazellen	20
3. Vorversuche für die Etablierung eines homologen Drosophila Suppressionssystems	21
4. Die Xenopus Oocyte als Testsystem für Nonsense-suppressor tRNA	25
5. Teste der Drosophila tRNAs auf Nonsensesuppression	30
6. Tyrosin tRNA im TMV Suppressionstest	35
7. Vergleichende Experimente im Retikulozyten " in vitro" System	40
8. Die Terminationscodonen in einer eukaryontischen Zelle, der Xenopus laevis Oocyte	45
DISKUSSION	51
1. Screening- und Testsysteme für den Nachweis einer Drosophila Suppressor tRNA	51
2. Die <u>Su(dx)</u> -spezifische Arginin tRNA	56
3. Drosophila tRNA im Nonsensesuppressionstest	58
4. Tyrosin tRNA und TMV Readthrough Aktivität	61
5. Termination der Proteinsynthese bei Eukaryonten	66

EXPERIMENTELLES VERFAHREN	70
1. Verwendete Drosophilastämme und Zuchtbedingungen	70
2. Genetische Experimente	70
3. Extraktion von tRNA und ribosomalen Proteinen. Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese	72
4. Vorfraktionierungen und Reinigung von Drosophila und Hefe tRNA. Präparation von mRNA	73
5. Suppressionsteste	75
ZUSAMMENFASSUNG	79
ABKUERZUNGEN	81
LITERATURVERZEICHNIS	82

EINFUEHRUNG

Eines der interessantesten Probleme der Molekularbiologie ist es, die Moleküle und Mechanismen zu verstehen, welche die genetische Information in sichtbare Strukturen, Farben und Formen, übersetzen. Diese Reaktionskette "vom Gen zum Phän" hat sich als ausserordentlich komplex herausgestellt. Morphologen, Embryologen und Genetiker haben die Phäne und ihre Entstehung in vielen Fällen genau beschrieben, ohne jedoch Einsicht in die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu gewinnen. Auf der anderen Seite ist es aufgrund entscheidender technischer Fortschritte seit einigen Jahren möglich, Gene zu isolieren und ihre Funktionsweise im isolierten Zustand kennenzulernen. Obschon dieser Lösungsweg sehr vielversprechend erscheint, wird es sich als notwendig erweisen, für das Verständnis der ganzen Reaktionskette die Erkenntnisse von beiden komplementären Sichten zusammenzubringen und ineinander zu verarbeiten.

Suppression bietet sich als Modellsystem, aber auch als Werkzeug für das Studium der Gen-Phän Wirkungskette an. Der genetische Begriff der Suppression ist definiert als "die Unterdrückung eines mutanten Phänotyps, beruhend auf einer Mutation, welche an einer anderen Stelle des Genoms als die primäre, den mutanten Phänotyp bewirkende Mutation lokalisiert ist" (Sturtevant, 1920). Es handelt sich bei der Suppression also um Wechselwirkungen zwischen zwei Gen-Phän Reaktionsketten. Gelingt es, eine der beiden Ketten molekular zu interpretieren, ergibt sich auch eine Erleichterung für das Studium der zweiten. Ein solches Modellsystem kann ein plastisches Bild von den netzartigen Verflechtungen aller dieser Reaktionsketten geben.

Suppression kann auf jeder denkbaren Stufe zwischen Gen und Phän erfolgen. Am unmittelbar wertvollsten erweist sich jedoch die informationelle Suppression (Gorini, 1970), da sie sich als Werkzeug für das Identifizieren unbekannter Gen-Phänwirkungsketten anbietet. Informationelle Suppression beruht auf einer fehlerhaften Interpretation der genetischen Information: eine Transfer RNA oder ein ribosomales Protein oder ein anderer Bestandteil des Decodierungsapparates ist derart mutiert, dass ganz bestimmte Fehlzuordnungen

gen von Nukleinsäure- zu Aminosäuresequenzen entstehen (Gorini, 1970). Eine Mutation im Anticodon einer Transfer RNA z.B. verleiht dieser eine neuartige Spezifität und befähigt sie unter Umständen, Terminations- oder Nonsensecodonen zu übersetzen. Eine solche Suppressor tRNA bewirkt einerseits das Entstehen von verlängerten Proteinen (= Readthrough Proteine), andererseits verhindert sie aber den verfrühten Kettenabbruch bei mutationell entstandenen, internen Nonsensecodonen, worauf auch der Suppressioneffekt (Nonsensesuppression) beruht (Capecchi und Gussin, 1965). Ist aber eine Suppressorwirkung als das Resultat einer mutierten tRNA erkannt, wird auch die Suche nach dem supprimierten Genprodukt erleichtert. Eine Suppressor tRNA kann für die Identifikation weiterer Nonsensemutationen verwendet werden, Nonsensemutationen wiederum für die Selektion neuer Suppressor tRNAs. Die Möglichkeit einer Suppressor tRNA, als wirkungsvolles Werkzeug eingesetzt zu werden, zeigt sich hier deutlich: wie durch das Auswerfen eines Netzes können Genprodukte, Zwischenglieder der Gen-Phän Wirkungskette, identifiziert werden und somit veränderte morphologische Strukturen auf defekte Moleküle zurückgeführt werden.

Nach diesen allgemeinen Ausführungen soll kurz umrissen werden, wie weit die Suppressionsforschung fortgeschritten ist und welcher Art die Erkenntnisse sind, die daraus erwachsen sind. Die erste Suppressormutation wurde 1919 von Bridges bei *Drosophila melanogaster* entdeckt (Bridges, 1919): suppressor of sable, (su(s)), allerdings erst 1927 von Bonnier als solche richtig interpretiert (Bonnier, 1927). Viel später gelang es, das genetische Phänomen der Suppression anhand einer bestimmten Klasse von rII Mutanten des Coliphagen T4 ("ambivalente Mutanten") molekular zu deuten (Benzer und Champe, 1962). Seither sind unzählige Arbeiten über Suppressormutationen erschienen (Körner et al., 1978; Smith, 1979; Steege und Söll, 1979; Söll et al., 1980). In vielen Fällen ist es gelungen, die Suppressormutation im Anticodon einer tRNA zu lokalisieren (Goodman et al., 1968) oder aber dem Strukturgen eines ribosomalen Proteins zuzuordnen (str, ram; Ozaki et al., 1969; Zimmermann et al., 1971). Zwei interessante Ausnahmen wurden dabei gefunden: ein UGA Suppressor von *E.coli* wurde auf eine Basensubstitution (G→A) im Dihydrouridinstamm der Tryptophan tRNA zurückgeführt (Hirsh, 1971), während der rezessive UGA Suppressor supK bei *Salmonella* in einer

mutierten Methylase und entsprechend untermethylierten tRNAs für Serin und Alanin begründet ist (Reeves und Roth, 1971; Pope et al., 1978).

Aehnlich erfolgreich wie bei Prokaryonten verlief die Suche nach Suppressor tRNAs bei Hefe. Aufgrund einer eleganten und präzisen Genetik konnten verschiedene Klassen von tRNA-abhängigen und ribosomalen Suppressoren vorausgesagt werden (Hawthorne und Leupold, 1974; Sherman et al., 1979), und in der Folge gelang es auch, die Voraussagen mit der Sequenz einer mutierten Suppressor tRNA zu bestätigen (Piper et al., 1976; Kohli et al., 1979). So konnten bei Hefe alle drei Typen von tRNA Suppressoren (amber, ochre, UGA Suppressoren) gefunden werden, darunter auch rezessive Suppressoren, und in jedem bisher bekannten Fall liegt die Mutation im Anticodon der tRNA. Hingegen gelang es trotz mehrfachen Anstrengungen nie, eine Suppressor tRNA bei einem höheren Eukaryonten nachzuweisen (Celis und Smith, 1979). Auf mögliche Erklärungen solcher Misserfolge soll in einem späteren Abschnitt eingegangen werden.

Suppressor tRNAs spielten bei der Aufklärung der prokaryontischen Proteinsynthese eine Schlüsselrolle. Wichtige Erkenntnisse in bezug auf die Interaktionsweise von Aminoacyl-tRNA Synthetasen mit tRNA Molekülen (Yarus et al., 1977) – eine der bestaufgeklärten Interaktionen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren –, den Rhythmus und die Genauigkeit des Decodierungsprozesses im Ribosom (Kurland, 1979), den Einfluss von benachbarten Basen in der Messenger RNA (Feinstein und Altman, 1978; Bossi und Roth, 1980) und von modifizierten Basen im und neben dem Anticodon der Transfer RNA (Geftter und Russel, 1969; Colby et al., 1976; Grosjean et al., 1978) auf die Codon-Anticodon Wechselwirkung, also ganz generell in bezug auf die Struktur und Funktion von Transfer RNA wurde beim Studium von Suppressor tRNAs gewonnen. Des weiteren wurde eine Genetik von tRNA Genen möglich; Einsichten in die tRNA Genanordnung (Smith, 1972) und auch in die Maturation von tRNA Molekülen (Altman, 1978) ergaben sich. Andersartig ist die Zielsetzung, wenn man nach Suppressoren bei Eukaryonten sucht und sie als Forschungswerkzeug einsetzt. So konnte beispielsweise mit der Isolation von Suppressor tRNA Genen bei *S.cerevisiae* zum ersten Mal gezeigt werden,

dass Introns in aktiven Genen vorhanden sein können (Goodman et al., 1977) und dass sie für die Expression dieser Gene keine Rolle spielen (Wallace et al., 1980). Nur mit Hilfe einer UGA Suppressor tRNA war es möglich, mitochondriale mRNA in einem cytoplasmatischen Extrakt zu übersetzen (DeRonde et al., 1980; das UGA Codon spezifiziert in Mitochondrien Tryptophan; Barrell et al., 1979). Als weiteres Beispiel für die Anwendung von Suppressor tRNAs soll in dieser Arbeit ein Experiment beschrieben werden, mit welchem versucht wurde, die Verteilung der drei natürlichen Terminationscodonen in einer eukaryontischen Zelle quantitativ zu erfassen.

Der wesentlichste Anwendungsbereich einer Suppressor tRNA bei einem höheren Eukaryonten wurde bereits anfangs skizziert. Gelänge es beispielsweise, die Wirkungsweise von su(s) auf eine Suppressor tRNA zurückzuführen, so wäre nicht nur die molekulare Basis dieser morphologisch beschriebenen Suppressormutation geklärt, sondern es bestünde auch die Möglichkeit, die Genprodukte der supprimierten mutanten Gene vermilion, speck, sable und purple zu identifizieren. Durch Einkreuzen von su(s) in entwicklungsbiologisch interessante Mutanten, z.B. homoiotische, könnte ein umfassendes Screening nach Nonsensemutationen in diesen Genen einfach durchgeführt werden; jeder Fall von erfolgreicher Suppression liesse darauf schliessen, dass das entsprechende mutierte Gen für ein Protein codiert, nicht etwa für eine RNA, oder gar eine Regulationssequenz darstellt. Nebst dieser wichtigen Funktion in der biochemischen Aufklärung morphologisch beschriebener Mutanten kann das Instrument einer Suppressor tRNA auch zur Beantwortung von Fragen eines eventuellen stadien- oder gewebespezifischen Einsatzes von tRNA Genen verwendet werden. Ebenso könnten Genverschiebungen oder Geninaktivierungen aufgrund beweglicher genetischer Elemente im Falle von Suppressor tRNA Genen verfolgt werden. Für die Ausarbeitung eines Transformationssystems bei *Drosophila* konnten Suppressor tRNA Gene von grossem Wert sein. Entscheidend für die Beantwortung solcher Fragen ist dabei stets, dass für Suppressor tRNAs bei *Drosophila* sowohl Genlokalisierung mittels direkter "in situ" Hybridisierung möglich ist (Kubli, 1980), dass Suppressor tRNA Gene aber auch genetisch lokalisiert werden können, da sie einen erkennbaren

Phänotyp bewirken.

Nach diesen Ausführungen erscheint es offensichtlich, dass die Aufklärung von Suppression nicht nur grundlegende Einsichten in die mechanistischen Beziehungen zwischen Gen und Phän ermöglicht, dass aber auch eine Suppressor tRNA ein unschätzbares Werkzeug für die experimentelle Lösung ganz verschiedenartiger Fragen sein kann. Trotz grossem Aufwand ist es bisher weder gelungen, einen einzigen Fall von Suppression bei höheren Eukaryonten molekular zu erklären, noch eine einzige Suppressor tRNA nachzuweisen (Celis und Smith, 1979). Verschiedene Gründe mögen dafür verantwortlich sein. Bei Säugerzellen sind zwar mehrere Nonsensemutationen beschrieben worden (Capecchi et al., 1977; Gesteland et al., 1978; Caskey et al., 1979; Cremer et al., 1979; Secher et al., 1979); es konnte deshalb eine gezielte Selektion von Suppressor tRNAs (Induktion von Revertanten) durchgeführt werden (Capecchi et al., 1977; Caskey et al., 1979). Allerdings muss ein solches Selektionssystem auch Revertanten als solche erkennen können, die nur wenige Prozente des Wildtypproteins oder der Wildtypaktivität aufweisen, was z.B. im Falle des HGPRT Systems nicht zutrifft. Das selektive Medium lässt nur Revertanten mit mehr als 40% Wildtypaktivität zu (Celis et al., 1979), eine Schwelle, die bei tRNA-abhängiger Suppression kaum überschritten würde. Bei *Drosophila* und bei *Caenorhabditis elegans* existieren zwar solche Selektionssysteme und auch genetisch-morphologisch beschriebene Suppressormutanten (Lindsley und Grell, 1967; Sofer und Hatkoff, 1972; Waterston und Brenner, 1978); trotzdem gelang der Nachweis einer Nonsensemutation bisher nicht. Zusammenfassend gesagt fehlen im allgemeinen die biochemisch-genetischen Grundlagen für eine wahrscheinliche Voraussage oder Induktion von tRNA Suppressoren. Auf der anderen Seite sind die bisher beschriebenen Nachweissysteme für Nensesuppressoraktivität zu wenig sensitiv oder artefaktanfällig, und die bisher durchgeführten Tests in diesen Systemen wurden stets mit tRNA Rohextrakten vorgenommen, eine Kombination von Bedingungen, die einen wahrscheinlichen Erfolg ausschliessen.

In dieser Arbeit wurde versucht, ein möglichst umfassendes Screening nach tRNA und zum Teil auch ribosomalen Suppressoren durchzuführen. Als Ausgangsmaterial wurden die 21 bekannten und

erhältlichen morphologisch beschriebenen Suppressormutanten von *Drosophila melanogaster* gewählt, wobei ein Schwerpunkt bei denjenigen Mutanten gesetzt wurde, deren Lokalisation in die unmittelbare Nähe eines tRNA Locus fällt (Su(S), Su(ss)², su(Hw)², su(t)) oder deren Suppressionsmuster eine Allelspezifität zeigt (su(f), su(s)², su(Hw)², su(w^a)). Das Screening bestand in einem ersten Teil in der vergleichenden Analyse von total tRNA und ribosomalen Proteinen dieser Mutanten mittels hochauflösender zweidimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese. In einem zweiten Teil wurde nach einem Testsystem gesucht, das möglichst sensitiv und wenig artefaktanfällig den Nachweis von tRNA Nonsensesuppressoraktivität erlaubt. Es bot sich die *Xenopus* Oocyte als effizientes proteinsynthetisierendes "in vivo" System an; als Indikation für erfolgte Nonsense-suppression dient dabei die Synthese eines Readthrough Produktes, welches im Falle von Kaninchen Globin mRNA UGA-Suppressor-abhängig ist. Die tRNA aus den Suppressormutanten wurde vor dem Test vorfraktioniert, damit eventuelle niedereffiziente Suppressoren angereichert würden und mit höherer Wahrscheinlichkeit erfasst werden könnten. Bei diesem Vorgehen sind die Bedingungen so optimal, dass eine Suppressor tRNA als Produkt eines einzigen mutierten Gens entdeckt werden müsste oder dass bei negativem Ausgang der Tests mit grosser Wahrscheinlichkeit die Existenz einer Suppressor tRNA in der untersuchten Stichprobe ausgeschlossen werden kann. Gleichzeitig ist ein Testsystem ausgearbeitet worden, das zukünftige Anwendung für die Analyse potentieller Suppressor tRNA finden kann.

RESULTATE

A Analyse von tRNA und ribosomalen Proteinen mittels zweidimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese

1. Ribosomale Proteine

Ribosomale Proteine wurden aus maximal 70-stündigen Larven und 3 bis 5-tägigen Adulten folgender Suppressorstämme isoliert und auf zweidimensionalen Gelen aufgetrennt: su(f), su(s)², su(w^a), su(Hw)², Su(ss)², Su(S), su(t). In den gewählten Stadien bleibt das Muster der ribosomalen Proteine konstant (Lambertsson, 1975); stadienspezifische Unterschiede wurden somit vermieden.

Die Ausbeute der ribosomalen Proteine betrug 0.2-0.3 mg/g nasse Larven und 1-2 mg/g Fliegen. Der Vergleich der je sieben Muster ergab weder qualitative noch prominente quantitative Unterschiede (Fig. 1a und b). Diese Aussage beruht auf der Auswertung je zweier Extraktionen pro Genotyp und Stadium.

2. Transfer RNA

Transfer RNA wurde aus 3 bis 6-tägigen Larven und 3 bis 6-tägigen Adulten aller 21 Suppressorstämme extrahiert. Die Ausbeute von 4 S RNA nach Sephadex G-100 Chromatographie betrug durchschnittlich 5 OD₂₆₀/g nasse Larven und 7.6 OD₂₆₀/g Fliegen. Letzterer Wert liegt deutlich und reproduzierbar unter demjenigen des Wildtyps: die Ausbeute beträgt hier 9-10 OD₂₆₀/g Fliegen. Die erniedrigte Ausbeute bei den Suppressorstämmen kann weder durch die Zuchtbedingungen (eventuelles Crowding) noch durch längeres Aufbewahren der gefrorenen Fliegen erklärt werden. Sie muss vermutlich in Zusammenhang mit dem allgemein schlechten physiologischen Zustand der Mutanten gebracht werden, der sich beispielsweise auch in einer z.T. stark erniedrigten Fertilität ausdrückt.

Für ein erstes Screening nach tRNA Musterabnormitäten wurden dritte Larvenstadien der Stämme su(f), su(t), su(s)², su(w^a), su(Hw)², Su(ss)², Su(S), Su(dx), su(pr^B), Su(er) uniform mit

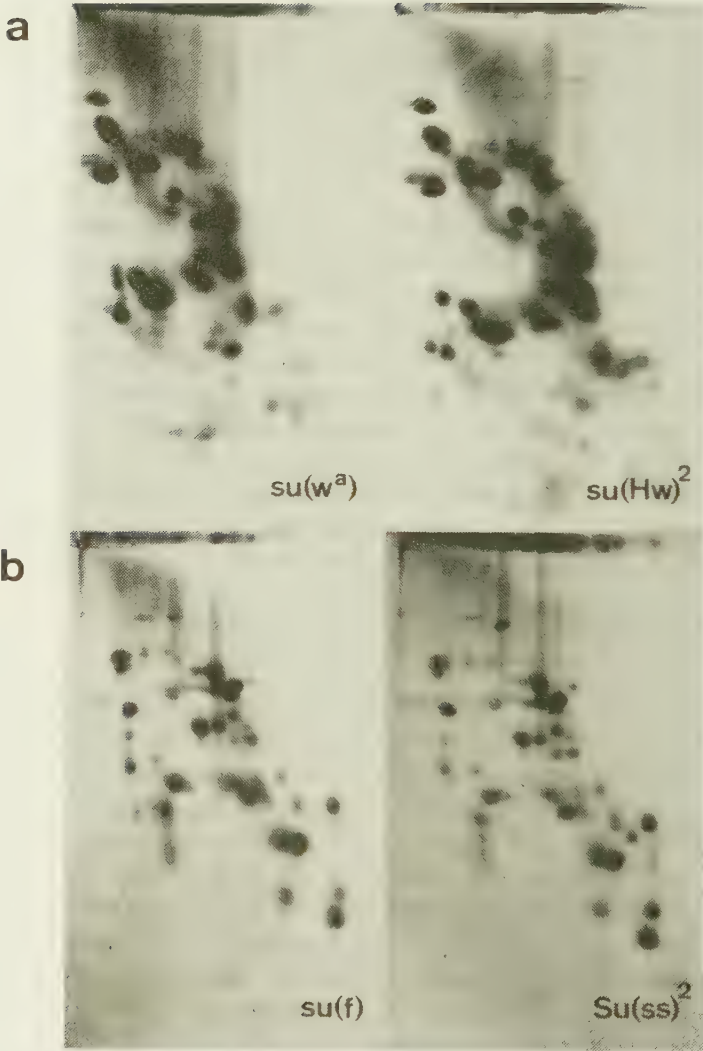


Fig.1: Beispiele Amidoschwarz-gefärbter Gele von larvalen (a) und adulten (b) ribosomalen Proteinen. Es konnten keine Unterschiede bei den untersuchten *Drosophila* Suppressorstämmen gefunden werden.

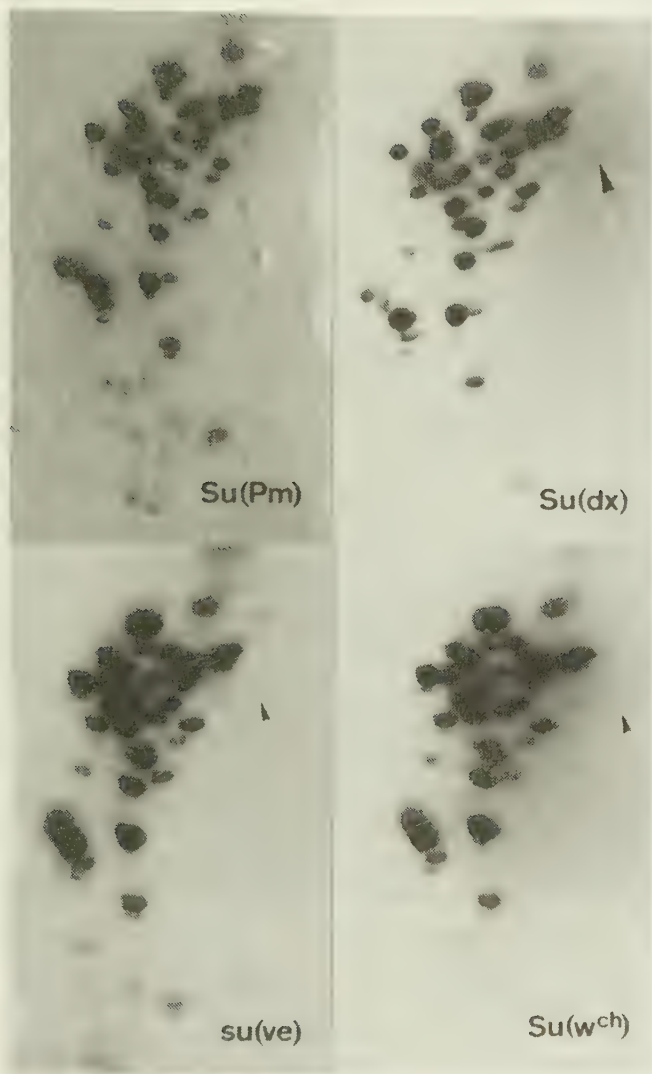


Fig.2: Beispiele Stainsall-gefärbter Gele von adulter tRNA. Die stammspezifische tRNA (Pfeil) ist bei Su(dx), su(ve) und Su(w^{ch}) sichtbar (ferner bei su(pd), nicht gezeigt), nicht aber bei den andern 17 Suppressorstämmen noch beim Wildtyp von *Drosophila*.

[³²P]-Phosphat radioaktiv markiert. Es zeigte sich, dass das tRNA Muster von Su(dx) einen zusätzlichen schwachen Flecken in der Region der weniger mobilen tRNAs aufwies. Dieser Flecken wurde reproduzierbar gefunden, unabhängig davon, ob larvale oder adulte, radioaktiv markierte oder unmarkierte tRNA analysiert wurde. Eine biochemische Analyse des Fleckens, durchgeführt von E.Züblin (Züblin, 1980), ergab, dass es sich dabei höchstwahrscheinlich um eine Arginin tRNA handelt. An derselben Stelle im Gel wurde ein schwacher Flecken ebenfalls bei su(pd), su(ve) und Su(w^{ch}), weder aber in den anderen 17 Suppressorstämmen noch im Wildtyp beobachtet. Aufgrund der elektrophoretischen Mobilität wird angenommen, dass es sich um dasselbe tRNA Molekül handelt, obwohl dies nicht durch biochemische Charakterisierung geprüft wurde. Das Resultat wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese von larvaler und adulter tRNA aller 21 Suppressorstämme gewonnen

Genetische Analyse: In Zusammenarbeit mit E.Züblin (Züblin, 1980) konnte das Auftreten der Su(dx)-spezifischen tRNA^{Arg} dem zweiten Chromosom des Stammes Su(dx) zugeordnet werden (unabhängig, ob in einer oder zwei Dosen vorhanden); zudem wurde ein Gendosis-effekt festgestellt. Für die Bestätigung dieses Resultates wurden die gleichen Kreuzungen nochmals durchgeführt. Dazu wurden wieder Fliegen mit je einem der drei Hauptchromosomen von Su(dx) in einer oder zwei Kopien nebst Markerchromosomen konstruiert und mit [³²P]-Phosphat gefüttert. Die tRNA Muster der sechs Genotypen bestätigten das erste Resultat über die Lokalisierung und Dominanz der Ursache des Su(dx)-spezifischen Fleckens: 2.Chromosom, dominant (Fig. 3). Der Dosis-effekt konnte ebenfalls durch direktes Zählen der Radioaktivität im Flecken nachgewiesen werden (Tabelle 1). Eine Fingerprintanalyse des Fleckens bestätigte die Identität mit der Su(dx)-spezifischen tRNA^{Arg} (Resultat nicht gezeigt).

Das gleiche Experiment wurde für die Lokalisierung des zusätzlichen Fleckens in den Mutanten su(pd), su(ve) und Su(w^{ch}) wiederholt. Die Auswertung konnte jedoch nur auf einer qualitativen Basis erfolgen, da die Radioaktivität im interessierenden Flecken zu gering im Vergleich zum Background war. Dennoch weisen die Resultate darauf hin, dass das Auftreten des zusätzlichen Fleckens in allen

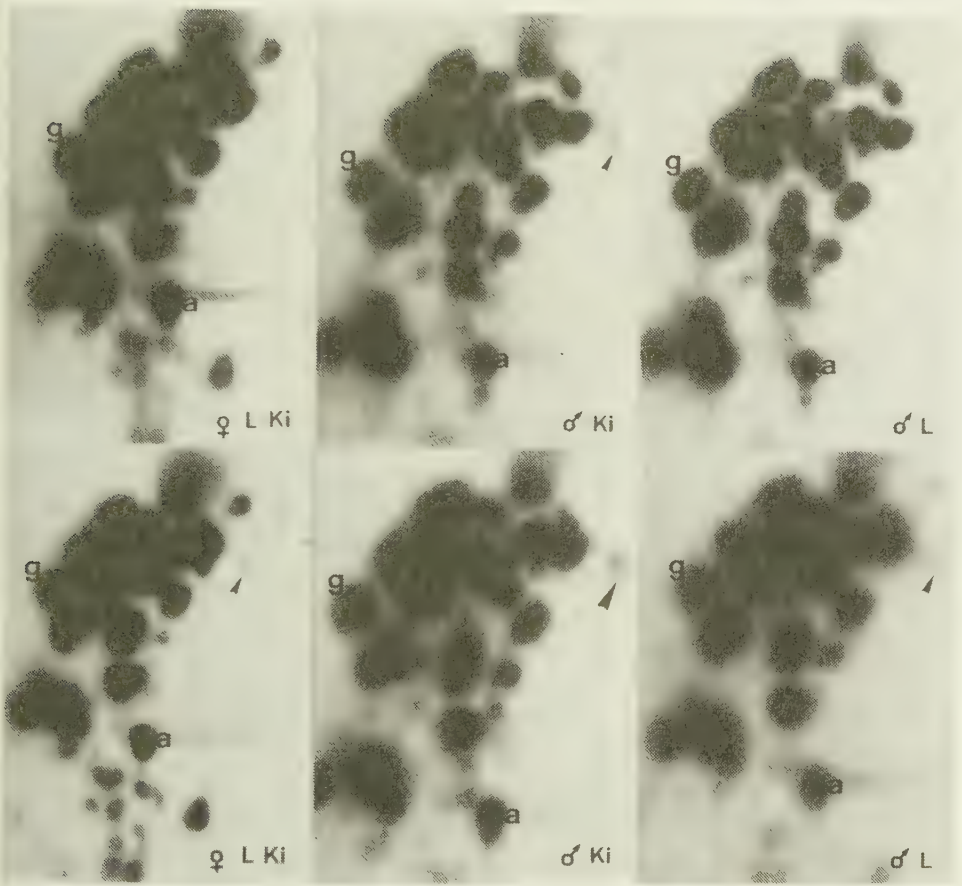


Fig.3: Genetische Lokalisation der stammspezifischen $tRNA^{Arg}$ (Pfeil) bei $Su(dx)$. Autoradiogramme von $[^{32}P]$ -markierter tRNA der 6 angegebenen Phänotypen der Filialgeneration II (obere Reihe: "Rückkreuzung" mit dem Wildtyp, untere Reihe: Rückkreuzung mit $Su(dx)$). Das Auftreten der stammspezifischen $tRNA^{Arg}$ korreliert mit dem Vorhandensein des 2.Chromosoms von $Su(dx)$. g = $tRNA^{Gly}_3$, a = $tRNA^{Arg}_2$

Tabelle 1

Genetische Lokalisierung der Su(dx)-spezifischen tRNA^{Arg} mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese radioaktiv markierter tRNA. In der 3. und 4. Kolonne ist die visuelle Auswertung, in den folgenden fünf Kolonnen die quantitative Auswertung gegeben.

Phänotyp*	(Chromosomen von <u>Su(dx)</u>)	tRNA ^{Arg} <u>Su(dx)</u>	Markierung gesamthaft	cpm - BG in 1. tRNA ^{Arg} <u>Su(dx)</u>	2. tRNA ^{Arg} tRNA ₂	3. tRNA ^{Gly} tRNA ₃	Quotient · 10 ⁻³ 1/2 1/3
♀ <u>L</u> <u>Ki</u>	X	-	+++	74	6612	7069	11.2 10.5
♂ <u>Ki</u>	2	+	++	125	2901	2645	43.1 47.3
♂ <u>L</u>	3	-	+	64	1818	1955	35.2 32.7
♀ <u>L</u> <u>Ki</u>	X, X/2/3	+	+++	156	11700	12499	13.3 12.5
♂ <u>Ki</u>	2, X/2/3	+	+	157	1763	1945	89.1 80.7
♂ <u>L</u>	3, X/2/3	+	++	123	2808	3211	43.8 38.3

* obere drei Phänotypen: "Rückkreuzung" mit dem Wildtyp,
untere drei Phänotypen: Rückkreuzung mit Su(dx)

Tabelle 2

Genetische Lokalisierung des Stamm-spezifischen RNA Fleckens bei $\underline{\text{su(pd)}}$, $\underline{\text{su(ve)}}$ und $\underline{\text{Su(w}^{\text{ch}})}}$ mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese radioaktiv markierter tRNA. Es ist nur die visuelle Auswertung gegeben (siehe Text).

Phänotyp*	Chromosomen vom Suppressorstamm	Flecken vorhanden bei:		Markierung gesamtthaft bei:	
		$\underline{\text{su(pd)}}$	$\underline{\text{su(ve)}}$	$\underline{\text{su(pd)}}$	$\underline{\text{su(ve)}}$
$\text{♀ } \underline{\text{L}} \quad \underline{\text{Ki}}$	X	-	-	+++	++
$\text{♂ } \underline{\text{Ki}}$	2	+	+	++	+
$\text{♂ } \underline{\text{L}}$	3	-	?	++	+
$\text{♀ } \underline{\text{L}} \quad \underline{\text{Ki}}$	X, X/2/3	++	+	+++	++
$\text{♂ } \underline{\text{Ki}}$	2, X/2/3	+	+	++	+
$\text{♂ } \underline{\text{L}}$	3, X/2/3	?	+	?	+

? = Diagnose unsicher, da schwache Markierung oder schwierig zu bewertendes Gel

* s. Bemerkung bei Tabelle 1

drei Stämmen mit dem Vorhandensein des 2.Chromosoms des betreffenden Suppressorstammes korreliert werden kann, im Falle von su(pd) und su(ve) dominant, im Falle von Su(w^{ch}) rezessiv (Tabelle 2).

In einem zweiten Schritt wurde abgeklärt, ob nebst Su(dx) auch su(pd), su(ve) und Su(w^{ch}) eine supprimierende Wirkung auf den dx Phänotyp ausüben. Dies erfolgte durch Kreuzen der vier Stämme, des Wildtyps und eines weiteren Suppressorstammes (su(t)) als Kontrolle mit dem dx Stamm. Die daraus entstehenden Männchen sind genotypisch hemizygot für dx, zeigen also den deltex Phänotyp, ausser dieser werde durch das eingekreuzte Genom supprimiert. Deltex äussert sich in verdickten Flügelvenen, kurzen Extravenen und deltaähnlichen Venenendigungen am Flügelrand. Diese drei Merkmale wurden bei je 10 Männchen der Filialgeneration I entsprechend ihrer Ausprägung in vier Stufen (0,+,++,+++) bewertet (Tabelle 3; Fig. 4). Die Kreuzungsergebnisse wurden in einem zweiten Versuch bestätigt.

Die quantitative Auswertung zeigt einen schwachen, aber reproduzierbaren Suppressionseffekt der Mutantenstämme su(pd) und su(ve) auf dx, während das Genom von Su(w^{ch}) und die beiden eingekreuzten Kontrollgenome keinen Einfluss aufweisen. Der visuelle Eindruck von der Expressionsstärke von dx gründet sich vor allem auf die Verdickungen der ersten beiden Radialvenen und auf die Deltas, weshalb auch ein Suppressionseffekt diagnostiziert werden kann (Tabelle 3; Fig. 4). Die Suppression von dx durch Su(dx) ist offensichtlich, ebenso der Dosiseffekt von Su(dx), welches nur in homozygotem Zustand dx vollständig supprimiert.

In einem dritten Schritt wurde versucht, die Mutation Su(dx) auf dem 2.Chromosom genauer zu lokalisieren, damit die Voraussetzung geschaffen wurde, die Lokalisierung von Su(dx) mit derjenigen der Su(dx)-spezifischen tRNA^{Arg} exakt zu vergleichen. Die Interpretation des Resultats wurde dadurch erschwert, dass einerseits Su(dx) in heterozygotem Zustand dx nicht vollständig zu supprimieren vermag (s.Tabelle 3) und dass andererseits die Phänotypen einzelner Markermutationen den Phänotyp von dx teilweise oder ganz überdecken (vg, ev. a, px, mr). Zudem sind einige Markermutationen für den Organismus teilweise oder ganz letal (dp¹, vg), so dass einige



dxst/Y ; Su(dx)/Su(dx)



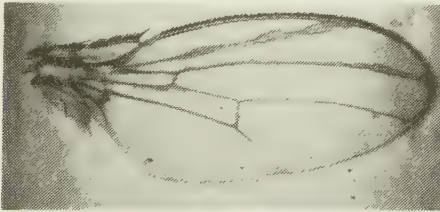
dx/Y ; Su(dx)/+



dx/Y ; su(ve)/+



dx/Y ; su(pd)/+



dx/Y ; +/+

Fig.4: Suppressionseffekt verschiedener eingekreuzter Genome von Suppressorstämmen auf die Expression von deltex. Die Flügel der angegebenen 5 Genotypen zeigen, dass su(ve) und su(pd) einen schwachen, Su(dx) einen starken Suppressionseffekt auf dx ausüben. Bei Su(dx) ist zudem ein Dosiseffekt sichtbar.

Tabelle 3

Suppression von δ letex durch verschiedene eingekreuzte Genome. Die Summenwerte (-, +, ++, +++ = 0, 1, 2, 3) von je 10 Männchen der Filialgeneration I sind für die einzelnen Radial-(r1-r4) und querverenen (q) angegeben. d - Delta, v - verdickte Flügelvenen, ev = Extravenen.

Genotyp*	Ausprägung von $\underline{dx}$	r1		r2		r3		r4		q3	
		d	v	d	v	d	ev	d	v	ev	v
$\underline{dx}/Y$	++++	13	24	10	11	10	11	10	3	1	0
$\underline{dx}/Y^{+}/+$	++++	13	18	15	14	12	3	17	5	0	0
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(t)/+$	++++	16	21	17	19	14	1	19	1	0	0
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(w^{ch})/+$	++++	16	28	14	10	10	2	12	2	16	0
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(pd)/+$	+++	16	9	10	9	10	0	12	0	1	1
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(vel)/+$	+++	11	9	10	11	8	5	8	1	0	5
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(dx)/+$	+	7	6	1	3	0	0	2	2	0	0
$\underline{dx}/Y; \underline{su}(dx)/\underline{su}(dx)$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*Die Marker Mutationen der Suppressorstämme sind nicht angegeben.

Crossovertypen zu selten oder gar nicht entstehen können. Dennoch weist das Resultat darauf hin, dass Su(dx) proximal von px, vermutlich zwischen px (2-100.5) und a (2-99.2) liegt, also ungefähr bei 2-100 (Tabelle 4). An dieser Stelle des Genoms kartiert auch eine "Minute" Mutation (M(2)1: 2-101.2; Lindsley und Grell, 1967).

Tabelle 4

Genetische Lokalisierung von Su(dx). Die Anzahl Nachkommen der Filialgeneration II sind aufgeführt. Es wurden wegen Subvitalität einiger Markermutationen nur 12 Phänotypklassen festgestellt.

Phänotyp	Anzahl	Bemerkungen
wild	92	
<u>dx</u>	37	gehören ev. zur Klasse "wild", da Expression von <u>Su(dx)</u> heterozygot nicht vollständig
<u>sp</u>	6	
<u>sp dx</u>	2	gehören ev. zur Klasse " <u>sp</u> ", s.oben
<u>mr sp</u>	10	
<u>mr sp dx</u>	1	gehört ev. zur Klasse " <u>mr sp</u> ", s.oben
<u>bw mr sp</u>	9	
<u>bw mr sp dx</u>	0	
<u>px bw mr sp</u>	5	
<u>px bw mr sp dx</u>	7	können nicht alle durch die obige Bemerkung erklärt werden, d.h. ein Anteil davon muss unsupprimiertes <u>dx</u> darstellen
<u>a px bw mr sp</u>	2	<u>dx</u> in Kombination mit <u>px</u> und <u>a</u> schwierig zu klassifizieren, d.h. gehören ev.zur Klasse <u>c</u> ? <u>a px bw mr sp dx</u>
mutant	32	mutant = <u>b</u> ? <u>pr</u> ? <u>cn vg c a px bw mr sp</u> ? <u>dx</u> ?

B Suche nach tRNA Nonsensesuppressoren

1. Vorfraktionierungen der tRNA

Die extrahierte tRNA aus 3 bis 6-tägigen Fliegen sämtlicher Suppressorstämme wurde mittels Reversed-Phase Chromatographie (RPC-5) in 7 - 9 Fraktionen aufgetrennt, womit eine 5 - 15-fache Anreicherung einzelner tRNA Isoakzeptoren erzielt wurde (Fig. 5a und b). Zusätzlich wurde larvale tRNA aller Suppressorstämme mittels benzoylierter DEAE-Cellulose (BDC) chromatographiert; hydrophob modifizierte tRNAs, unter denen sich bei Hefe die Klasse der Nonsensesuppressoren befindet, werden vom Säulenmaterial zurückgehalten und können nur mit Aethanol eluiert werden. Mit dieser Methode werden daher solche tRNA Isoakzeptoren mindestens 10-fach angereichert (Fig. 5a).

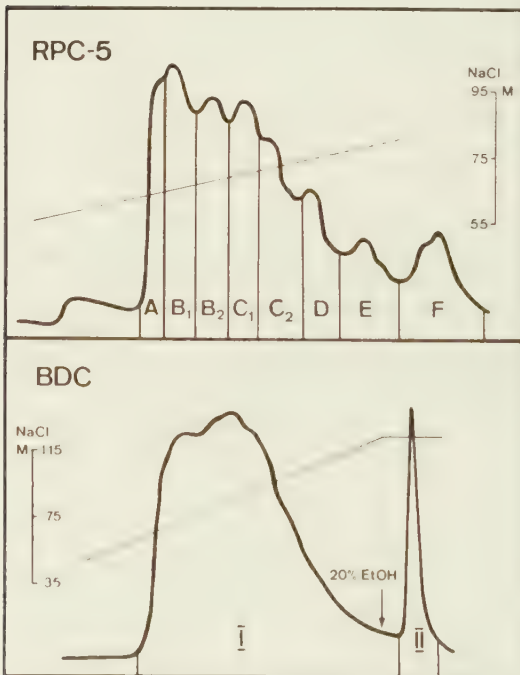


Fig.5a: Text s. nächste Seite

b

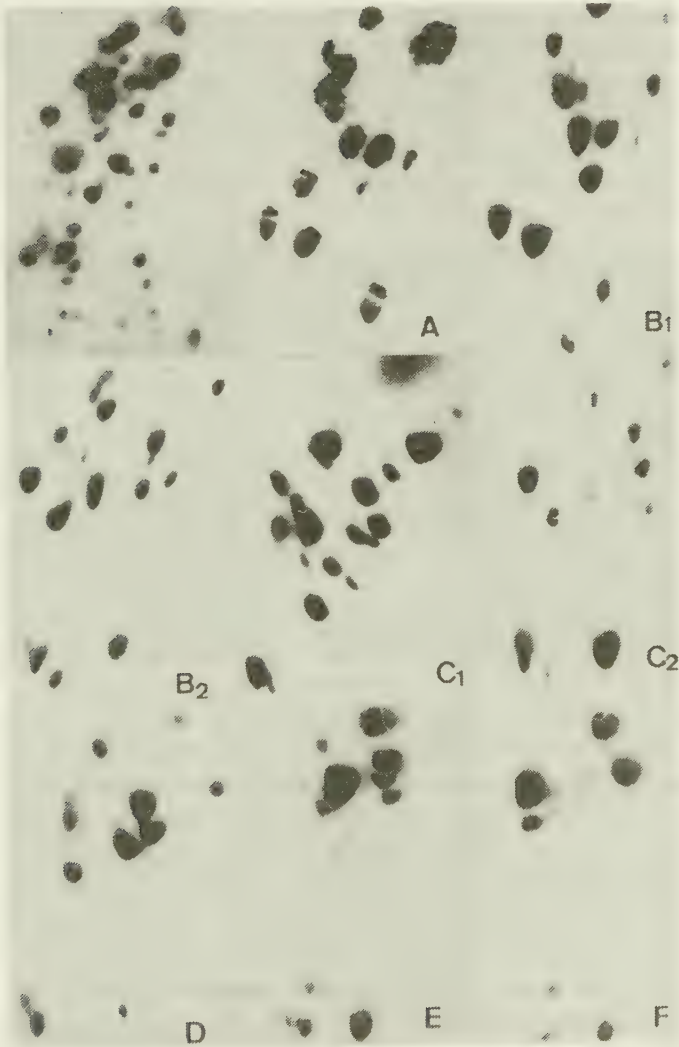


Fig.5: a) Gesamt-tRNA (Bsp. Su(dx)), auf RPC-5 oder BDC aufgetrennt. Die angeschriebenen Fraktionen wurden für Suppressionsteste verwendet.

b) tRNA Fraktionen nach RPC-5 Chromatographie, auf zwei-dimensionalen Gelen aufgetrennt (Bsp. Su(dx)), links oben ein Gel von Gesamt-tRNA, zum Vergleich).

2. Ochre Suppression in Maus Myelomazellen

In einem einzigen Fall bisher bei höheren Eukaryonten ist die Sequenz einer Messenger RNA mit einer "Nonsensemutation" partiell bekannt: die Mutante IF3 der Maus Myeloma Zelllinie MOPC 21 enthält eine Frameshiftmutation in der mRNA der schweren Immunglobulinkette (HC), was sehr bald zu einem UAA Codon und daher zu verfrühtem Kettenabbruch dieses Proteins führt (Secher et al., 1979). Da dieses mutierte Protein vom Wildtypprotein gut unterscheidbar ist, die beiden Immunglobulinketten den Hauptteil der sezernierten Proteine von Myelomazellen ausmachen und da zudem "in vitro" durch Zugabe einer Hefe ochre Suppressor tRNA ein verlängertes, wildtypähnliches Protein ausgehend von diesem mutanten Messenger synthetisiert werden konnte (Secher et al., 1979), bot sich die IF3 Zelllinie für den Nachweis von ochre Suppressoren an. Könnte die zu testende tRNA in diese Zellen hineingebracht werden, hätte man die Möglichkeit eines "in vivo" Tests für Nonsensesuppression geschaffen und zugleich die aufwendige Arbeit quantitativer mRNA Extraktion vermieden.

Für den Transfer von tRNA in die Myelomazellen wurde die Methode der PEG-induzierten Fusion tRNA-beladener RBC Ghosts (= entleerte rote Blutzellen) angewendet. Es wurde gezeigt (Celis et al., 1979), dass die somatischen Zellen nach mehreren Stunden Inkubation noch mindestens 0.2% der verwendeten vorfraktionierten tRNA als intakte Moleküle enthalten (in den hier verwendeten Myelomazellen 0.5 - 3 µg tRNA). Die unselektive Aufnahme von tRNA in die RBC Ghosts wurde mit zweidimensionaler Gelelektrophorese von tRNA aus beladenen Ghosts nachgewiesen (Resultat nicht gezeigt), und die Fusion der Ghosts mit den Myelomazellen im Lichtmikroskop oder mittels Aktivitätsnachweis des HGPRT Enzyms verfolgt, indem im letzteren Fall rote Blutzellen mit HGPRT-negativen Myelomazellen (Linie X63) fusioniert wurden (Resultate nicht gezeigt). Es gelang jedoch nicht, das System als Nonsensesuppressionstest zu etablieren. Hefe ochre Suppressor tRNA^{Tyr} und tRNA^{Ser} erwiesen sich trotz vorausgegangener partieller Reinigung und positivem Test auf Suppressionsaktivität (s.später) in der Myelomazelle als inaktiv

(Fig. 6). Auch die Fusion von Hefe Protoplasten des Stammes SUP5-o (ochre Suppressor) mit der IF3 Zelllinie konnte keine Suppression des UAA Codons induzieren (K.Kaltoft, persönliche Mitteilung). Trotz diesen negativen Resultaten wurde tRNA von 10 Drosophila Suppressorstämmen in den IF3 Zellen getestet; auch hier konnte keine Suppressionsaktivität festgestellt werden (Fig. 6).

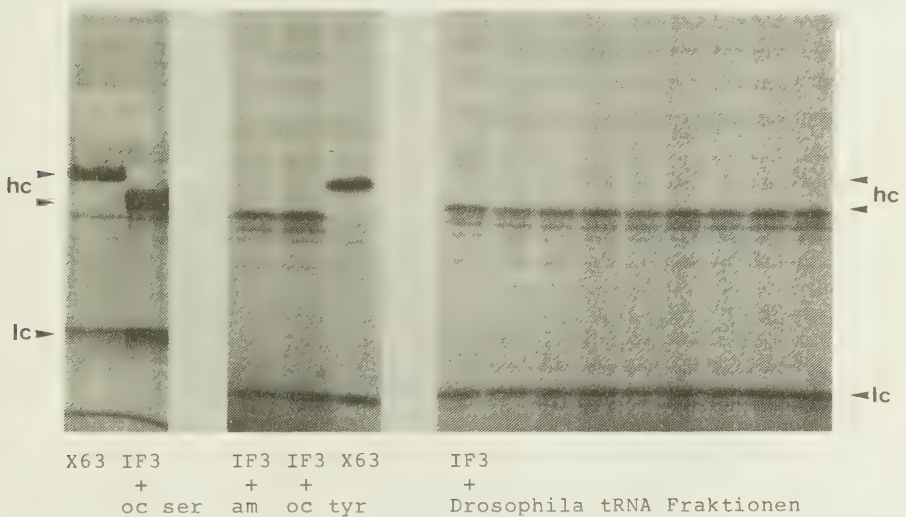


Fig.6: Autoradiogramme [^{32}P]-Methionin-markierter, von Myelomazellen sezernierter Proteine (hc = schwere, lc = leichte Immunoglobulinkette). Das verkürzte Protein der ochre "Nonsensemutante" IF3 kann weder mit Hefe amber (am) oder ochre (oc ser, oc tyr) tRNA noch mit Drosophila tRNA Fraktionen (Bsp. su(t)) supprimiert werden. X63 enthält das Wildtypprotein.

3. Vorversuche für die Etablierung eines homologen Drosophila Suppressionssystems

Die Verwendung eines homologen Testsystems für den Nachweis von Nonsensesuppression bei Drosophila bringt nebst grundsätzlichen Vorteilen gegenüber einem heterologen System den entscheidenden Vorteil mit sich, dass die aufwendige Aufbereitung vorfraktionierter tRNA nach langwieriger Massenzucht schlecht wachsender Mutanten umgangen werden kann. Damit eröffnet sich die Möglich-

keit, ein rasches Screening unter einer grossen Anzahl potentieller Suppressormutanten (z.b. Revertanten) durchzuführen. Zwei Ansätze sind theoretisch möglich: entweder wird eine Messenger RNA mit einem Nonsensecodon in eine Drosophila Zelle hineingebracht und die zellulär synthetisierten Proteine nach dem betreffenden Readthrough Produkt untersucht, oder die analoge Untersuchung wird durchgeführt "in vitro" mittels eines proteinsynthetisierenden S40 Ueberstandes von einem Drosophila Zellhomogenat. In beiden Fällen kann die zellulär vorhandene tRNA auf Suppressionsaktivität direkt getestet werden.

Transfer von Makromolekülen in Drosophilazellen: Bei eireifenden Insekten werden Dotterproteine aus der Hämolymphe von den Oocyten meistens durch Mikropinocytose aufgenommen. Diese Vorgänge können durch Trypanblau sichtbar gemacht werden (Telfer, 1961). Es wurde daher versucht, mittels einfacher Injektion von Farbstoff, mRNA oder Protein in das Abdomen junger Drosophila Weibchen diese Moleküle in die Oocyten hineinzubringen. Falls die Absorption von Makromolekülen bei Drosophila genügend effizient und unselektiv erfolgt, könnte mit dieser Methode die direkte Injektion von Molekülen in die Oocyten oder Eier umgangen werden, die wegen der Kleinheit und Beschaffenheit dieser Zellen bei Drosophila sehr zeitaufwendig ist und kaum in grösseren Serien durchführbar wäre.

Durch Injektion von radioaktiv markierten Aminosäuren wurde in einem ersten Schritt festgestellt, dass diese Aminosäuren vom Ovar absorbiert wurden und dass Proteinsynthese in genügendem Ausmass stattfand, wobei 1 bis 2-tägige Weibchen im Vergleich mit 1/2 oder 3-tägigen Weibchen eine bessere Inkorporation von Radioaktivität in Proteine zeigten. In einem zweiten Schritt wurde ermittelt, dass Trypanblau mit einer Effizienz von 0.05 - 0.5% in die Eikammern vor allem des Stadiums 10B (King, 1970) aufgenommen wurden (Fig. 7a). Dasselbe Experiment gelang nicht, wenn die Eireifung der Weibchen zuerst durch Kohlehydratfutter oder Virginalität für 10 Tage verzögert und erst kurz vor der Injektion durch Normalfutter oder Begattung induziert wurde: solche Weibchen zeigten ausschliesslich junge (bis Stadium 5) und reife Eier. Anstelle von Trypanblau wurde auch Hämoglobin oder fluoreszierendes Immunglobulin injiziert; diese Makromoleküle konnten aber in der Eikammer nicht eindeutig nachgewiesen werden, da das Braunrot des

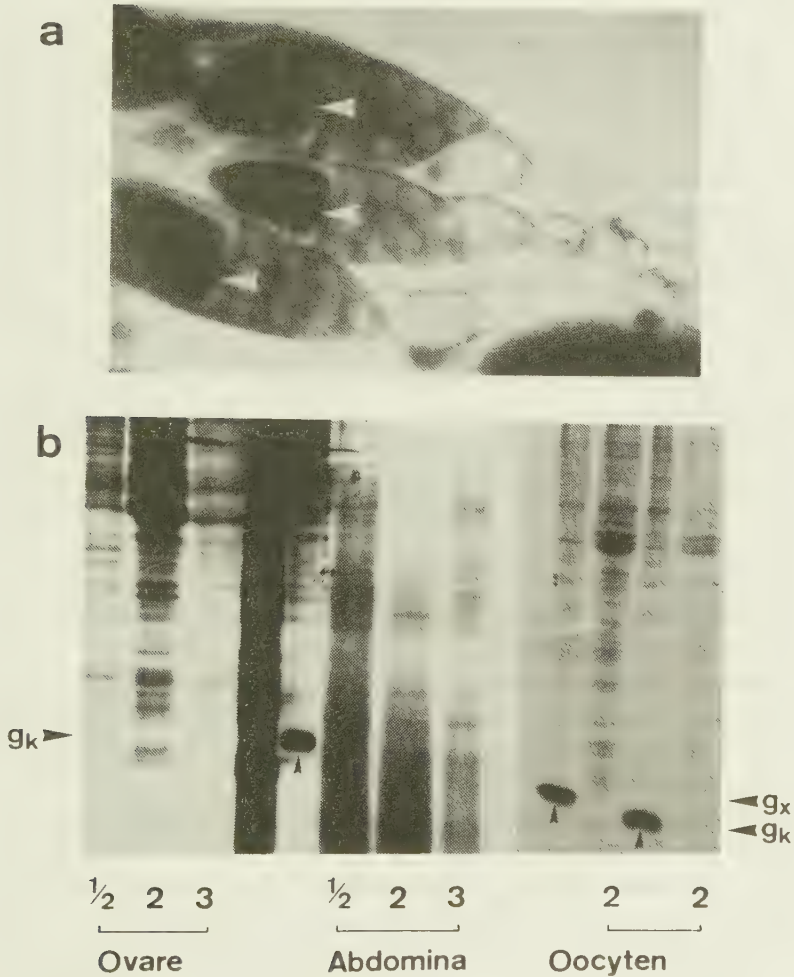


Fig.7: a) Teil eines *Drosophila* Ovars. Stadien 10B zeigen trypanblaufarbte Eikammern (Pfeil).

b) Autoradiogramme [^3H]-Histidin-markierter *Drosophila* Proteine aus Ovarien, Restabdomina oder seziierten blaufarbbten Oocyten nach Injektion von Globin mRNA in weibliche Abdomina (1/2-, 2-, 3-tägige Fliegen). Es konnte kein synthetisiertes Globin in den untersuchten Geweben entdeckt werden. g_k , g_x = Kaninchen, Xenopus Globin, in *Xenopus* Oocyten synthetisiert, als Referenz (Pfeil).

Hämoglobins im seziierten Ovar schwierig zu erkennen war und da die Fluoreszenz des Immunglobulins von einer starken Eigenfluoreszenz der Eikammer überdeckt wurde.

In einem dritten Schritt wurde Globin mRNA vom Kaninchen (4 µg/Fliege) oder von *Xenopus* (0.1 µg/Fliege) gleichzeitig mit Trypanblau und [³H]-Histidin (2 µCi/Fliege) injiziert, nach 6 bis 8 Stunden die blaugefärbten Oocyten aus dem Ovar herausseziert, homogenisiert und die synthetisierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamidelektrophorese analysiert. Die Detektion von synthetisiertem Kaninchen- oder *Xenopus*globin wäre zu erwarten, falls die Resorptionseffizienz der mRNA im Vergleich zu derjenigen von Trypanblau um einen Faktor 100 tiefer läge oder falls dieser Faktor 100 bei der Proteinsyntheseeffizienz bzw. bei der Nutzung der injizierten mRNA durch die *Drosophila* Oocyte eingebüßt würde (Vergleich *Xenopus* Oocyte). Es war jedoch nicht möglich, Spuren von Globin im *Drosophila* Oocytenextrakt nachzuweisen (Fig. 7b). Dasselbe Experiment war auch für frischgeschlüpfte oder 3-tägige Weibchen und auch bei der Analyse ganzer Ovarie oder Restabdomen negativ (Fig. 7b).

In Zusammenarbeit mit K.Kaltoft wurden Versuche gemacht, die schon beschriebene Methode der Fusion beladener RBC Ghosts auf *Drosophila* Zellen embryonaler Primärkulturen anzuwenden. Da die PEG Empfindlichkeitsspektren für die meisten Zellen sehr schmal und für die Kombination menschlicher Blutzellen mit *Drosophila*-zellen nicht überlappend sind (K.Kaltoft, persönliche Mitteilung) gelangen diese Versuche nicht.

"In vitro" proteinsynthetisierendes System von *Drosophila*:
 Von Scott et al. (1979) wurde für *Drosophila* ein "in vitro" proteinsynthetisierendes System ausgearbeitet, gut charakterisiert für die Anwendung von S40 Ueberständen von Zelllinienhomogenaten, weniger gut beschrieben für embryonale Extrakte. Falls das System aber für ein Screening nach Suppression bei mutanten Stämmen eingesetzt werden sollte, müssen Embryonen als Quelle für den proteinsynthetisierenden Extrakt verwendet werden können, da die Etablierung von Zelllinien aus einem Mutantenstamm sehr langwierig ist (Regenass und Bernhard, 1979). Es gelang jedoch nicht, mit embryonalen S40 Ueberständen vom Wildtyp Globin mRNA oder TMV RNA in Proteine zu übersetzen.

4. Die *Xenopus* Oocyte als Testsystem für Nonsensesuppressor tRNA

Die *Xenopus laevis* Oocyte eignet sich vorzüglich als protein-synthetisierendes "in vivo" System; eukaryontische Messenger RNAs irgendwelcher Herkunft können durch einfache Injektion in diese Zellen hineingebracht und von ihr mit grosser Effizienz und Genauigkeit in die betreffenden Proteine übersetzt werden (Gurdon, 1974). Es wurde auch nachgewiesen, dass heterologe tRNA von der Oocyte beladen und für die Proteinsynthese gebraucht werden kann (Gatica et al., 1975; Ginzburg et al., 1979). Zudem sind Oocyten einfach zu handhaben und jederzeit durch Operation eines Frosches in grossen Mengen erhältlich. Somit sind die wichtigsten Voraussetzungen für ein "in vivo" Suppressionstestsystem erfüllt.

Es war möglich, ein solches Testsystem, basierend auf der *Xenopus* Oocyte, für amber, ochre und opal Suppressoren zu etablieren. Erstens ergab die gleichzeitige Injektion von Kaninchen Globin mRNA (5 ng/Oocyte) und Hefe opal Suppressor tRNA^{Ser} (5 ng/Oocyte) nebst β -Globin (MW 16k) die Synthese eines längeren Proteins (18.5k; Fig. 8a). Dieses zweite Protein wird durch einen Readthrough des UGA (opal) Terminationscodons auf der β -Globin mRNA ermöglicht (Kohli et al., 1979); somit werden zusätzlich 23 Codonen übersetzt, wonach die Proteinsynthese durch zwei hintereinanderliegende UAA (ochre) Codonen terminiert wird. Die Identifikation der beiden Globinproteine auf dem eindimensionalen SDS-Gel erfolgte aufgrund des Molekulargewichtes, in Analogie zu "in vitro" Experimenten und durch Antikörperfällung (Fig. 8a). Amber und ochre Suppressoren sind in diesem Fall ohne Readthrough Effekt, obschon α -Globin durch ein UAA Codon terminiert wird. α -Globin wird jedoch in Absenz von Haemin nicht synthetisiert und kann auch durch Mikroinjektion von Haemin nur unreproduzierbar induziert werden (Giglionni et al., 1973). Zweitens konnte amber und ochre Suppression mit Injektion von Tabak Mosaik Virus RNA (50 ng/Oocyte) gezeigt werden, indem bei gleichzeitiger Injektion von Hefe amber oder ochre Suppressor tRNA^{Tyr} oder ochre Suppressor tRNA^{Ser} (5 ng/Oocyte) nebst einem 110k Protein ein 160k Readthrough Produkt nachzuweisen war. Das 160k Protein wurde in allen bisher angewendeten Systemen auch in Abwesenheit von Suppressoren beobachtet (Knowland, 1974; Pelham, 1978); sein Anteil in der Oocyte beträgt 7 - 11%. Dieser Prozentsatz bildet die

Backgroundschwelle, welche durch Injektion von Hefe opal Suppressor tRNA^{Ser} nicht überschritten wird (Fig. 8b). Die Identifikation des 160k Proteins als Readthrough Produkt geschah aufgrund einer Peptidanalyse (Pelham, 1978) - das 110k Protein ist demnach im 160k Protein am Aminoende enthalten -, und es wird vermutet, dass sich am Ende des 110k Proteins ein "leaky" UAG (amber) Terminationscodon befindet, welches mit amber oder, gemäss Wobble Regeln, auch mit ochre Suppressor tRNAs überlesen werden kann (Pelham, 1978). Eine Sequenz der RNA zur Bestätigung dieser Vermutung liegt zur Zeit nicht vor.

Für alle vier Suppressor tRNAs wurden Dosisabhängigkeitskurven erarbeitet, womit eine minimale Empfindlichkeitsschwelle festgestellt werden konnte (Fig. 9). Es zeigte sich, dass die Schwelle für einen Globin Readthrough bei 1 ng opal Suppressor tRNA^{Ser}/Oocyte, für den TMV Readthrough bei 1 ng tRNA^{Tyr} (bezieht sich nicht nur auf amber oder ochre tRNA^{Tyr}, sondern auch auf Wildtyp tRNA^{Tyr}, siehe später) oder 0.5 ng ochre Suppressor tRNA^{Ser}/Oocyte liegt. In beiden Fällen kann über 50% Readthrough erhalten werden (Globin 66%, TMV 61%); nur mit der ochre Suppressor tRNA^{Ser} kann dieser Sättigungswert nicht erreicht werden. Der vorliegende Reinigungsgrad von 2.5% lässt nur eine Injektion von optimal 5 ng, maximal 25 ng Suppressor tRNA/Oocyte zu, was einer tRNA Menge von 1.25 µg pro Oocyte entspricht. Oberhalb dieser Schwelle setzt eine Inhibition der endogenen Proteinsynthese ein. Wie auch in anderen Suppressionstesten beobachtet, spielt der Reinheitsgrad, bzw. die Menge kontaminierender und kompetitierender tRNA in der Probe auf die Suppressionseffizienz keine Rolle.

Es soll besonders hervorgehoben werden, da es für die späteren Resultate von Bedeutung sein wird, dass Magnesium Ionen oder Spermidin keinen Einfluss auf den TMV Readthrough zeigen (in beiden Fällen 7 - 11%, s. Fig. 9a). Dies steht im Gegensatz zu den "in vitro" Experimenten, welche eine Induzierbarkeit des 160k Proteins durch 1.4 - 2.1 mM Mg⁺⁺ oder 10 - 100 µM Spermidin in vergleichbarem Ausmass wie durch Suppressor tRNAs demonstrieren (Pelham, 1978; Morch und Benicourt, 1980). Die Oocyte erlaubt nur tRNA-induzierten und keinen "artifizialen" Readthrough.

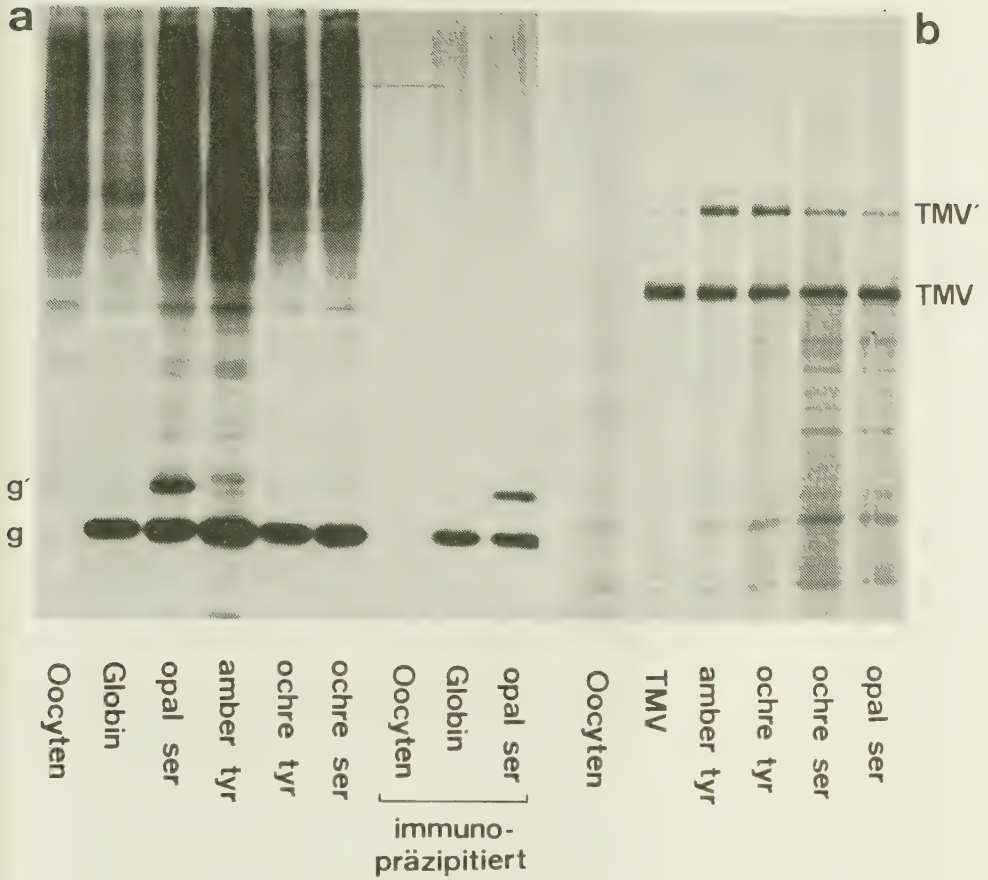
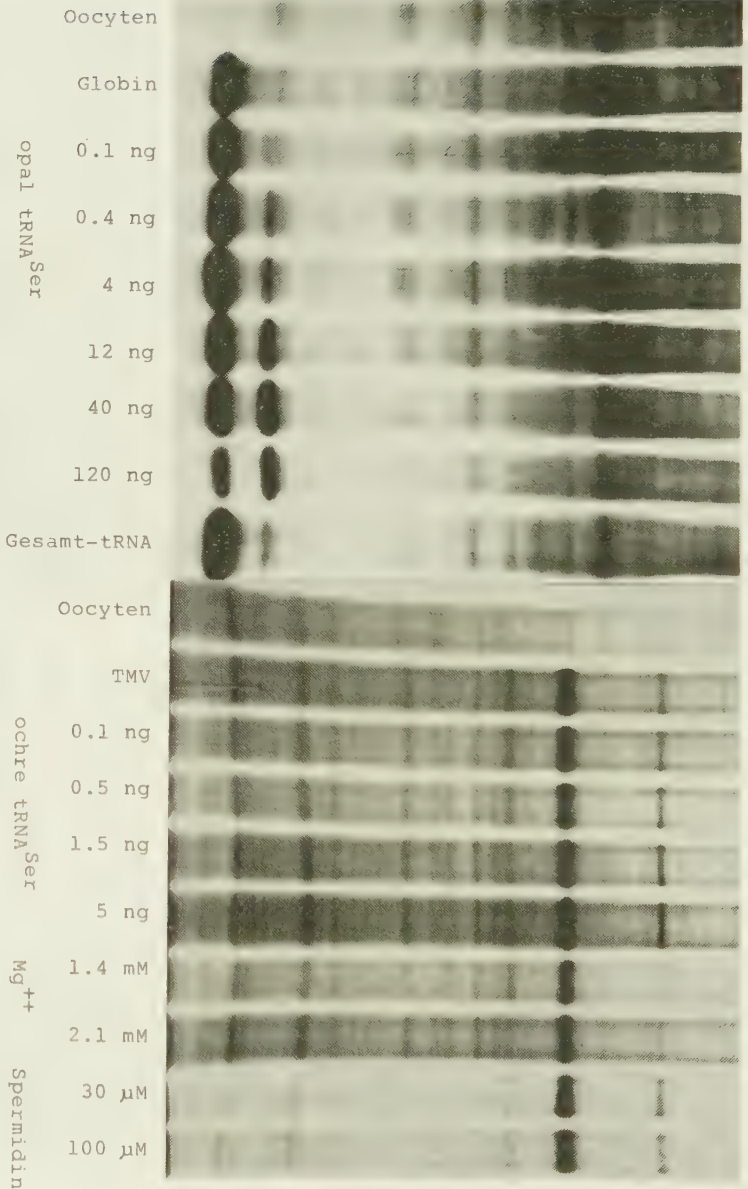


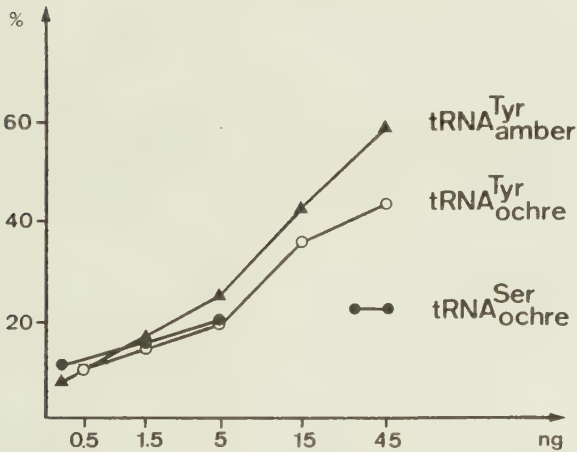
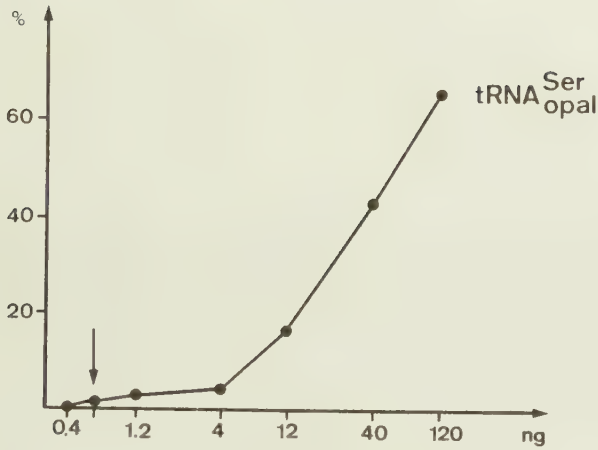
Fig.8: Autoradiogramme radioaktiv markierter Xenopus Oocyten Proteine nach Injektion von Kaninchen Globin mRNA (a) oder TMV RNA (b) und Hefe Suppressor tRNAs. Opal Suppressor tRNA^{Ser} supprimiert das Stopcodon (UGA) von Kaninchen Globin mRNA, amber und ochre Suppressor tRNA^{Tyr} oder tRNA^{Ser} supprimieren das Stopcodon (UAG?) des TMV 110k Proteins. g, g' = Globin und Globin Readthrough, TMV, TMV' = 110k und 160k Proteine von TMV.

Fig. 9:

a) Autoradiogramme radioaktiv markierter Xenopus Oocytenproteine nach Inkubation von Kaninchen Globin mRNA oder TMV RNA und verschiedenen Konzentrationen von Hefe Suppressor tRNAs, Mg^{++} oder Spermidin. Es besteht eine Dosisabhängigkeit der Readthrough Proteine von der Suppressor tRNA Konzentration (Mg^{++} , Spermidin: kein Effekt).



b



b) Dosisabhängigkeit der Readthrough Proteine als Funktion der Suppressor tRNA Konzentration. Die Abszisse gibt die Suppressor tRNA Konzentration pro Oocyte in logarithmischem Massstab an, damit die Empfindlichkeitsschwellen ersichtlich werden. Die Ordinate gibt den Prozentsatz des Readthrough Proteins an, wobei nur die Werte für den Globin Readthrough korrigiert werden konnten (die Readthrough Proteine sind länger als die zugehörigen normalen Proteine; die inkorporierte Radioaktivität ist daher pro Molekül höher). Der Pfeil weist auf den Readthrough Wert nach Injektion von Gesamt-tRNA des opal Suppressorstammes sup3-e hin. Die Backgroundschwelle für den TMV Readthrough (7-11%) ist punktiert eingezeichnet.

5. Tests der Drosophila tRNAs auf Nonsensesuppression

Der Nonsensesuppressionstest in der *Xenopus* Oocyte wurde für alle tRNA Fraktionen aus den *Drosophila* Suppressorstämmen angewendet. Unter der Annahme, dass eine potentielle *Drosophila* Suppressor tRNA die gleiche Aktivität wie die vier Hefe Suppressor tRNAs aufweist, kann berechnet werden, dass eine solche Suppressor tRNA 0.08 - 0.16% einer RPC-Fraktion oder rund 0.016% der Gesamt-tRNA ausmachen müsste, um im *Xenopus* Oocytentest noch erfasst werden zu können. Damit sind die Voraussetzungen gegeben, dass auch Suppressionsaktivität eines Nebenisoakzeptors, jedenfalls aber durch ein einziges mutiertes Gen entstandene Suppressoraktivität nachgewiesen werden könnte (0.08% der Gesamt-tRNA, *Drosophila* besitzt ca. 1200 tRNA Gene im diploiden Genom; Weber und Berger, 1976). Die Su(dx)-spezifische tRNA^{Arg} beispielsweise entspricht 0.1 - 0.2% der Gesamt-tRNA (berechnet aufgrund der [³²P]-Inkorporation, s. Tabelle 1, oder Ethidiumbromidfärbungen zweidimensional aufgetrennter Su(dx) tRNA).

Als Vorversuch wurde abgeklärt, ob *Drosophila* tRNA mit genügender Effizienz von der Oocyte aminoacyliert werden kann. Dieses Experiment fiel positiv aus: unter der Annahme, dass die Oocyte durchschnittlich 30 pmol einer Aminosäure enthält, konnten reine tRNA^{Arg} von *Drosophila* mit 320 pmol/OD₂₆₀ und reine tRNA^{Tyr} mit 170 pmol/OD₂₆₀ aminoacyliert werden. Diese Werte können mit den Aminoacylierungsversuchen mit *Drosophila* Enzymen verglichen werden, welche reine tRNA^{Arg} mit 1390 pmol/OD₂₆₀ und reine tRNA^{Tyr} mit 600 - 800 pmol/OD₂₆₀ beladen. Der Unterschied in der spezifischen Beladung liegt dabei vermutlich weniger in der Beladbarkeit, als im Versuchsansatz, welcher im Falle der Oocyte einen Nukleasenabbau ermöglicht (Inkubationszeit 2 h); im *Drosophila* "in vitro" Beladungsexperiment zeigt sich ein solcher Abbau bereits nach 15-minütiger Inkubation an (Olexa, 1977).

Für den opal Suppressionstest wurden die einzelnen RPC-5 Fraktionen sämtlicher Suppressorstämme (adulte tRNA) und zusätzlich die beiden BDC-Peaks (larvale tRNA) zusammen mit Globin mRNA injiziert. Die tRNA Proben mussten auf das sorgfältigste entsalzt werden; geringe Spuren von Salz führen bereits zu einer Inhibition der Synthese endogener Proteine und des Globins. Als maximale In-

jektionsmenge pro Oocyte wurden 0.6 µg für stark angereicherte und 1.2 µg für schwach angereicherte Fraktionen gewählt. Ebenso wurde die Su(dx)-spezifische tRNA^{Arg} in vorfraktionierter und gereinigter Form getestet. Alle Tests fielen eindeutig negativ aus (Fig. 10); Wiederholungen mit tRNA Fraktionen einer zweiten Extraktion der Mutanten su(f), su(t), su(s)², su(w^a), su(Hw)², Su(ss)², Su(S), Su(dx), su(pr)^B, Su(er) bekräftigten dieses Resultat.

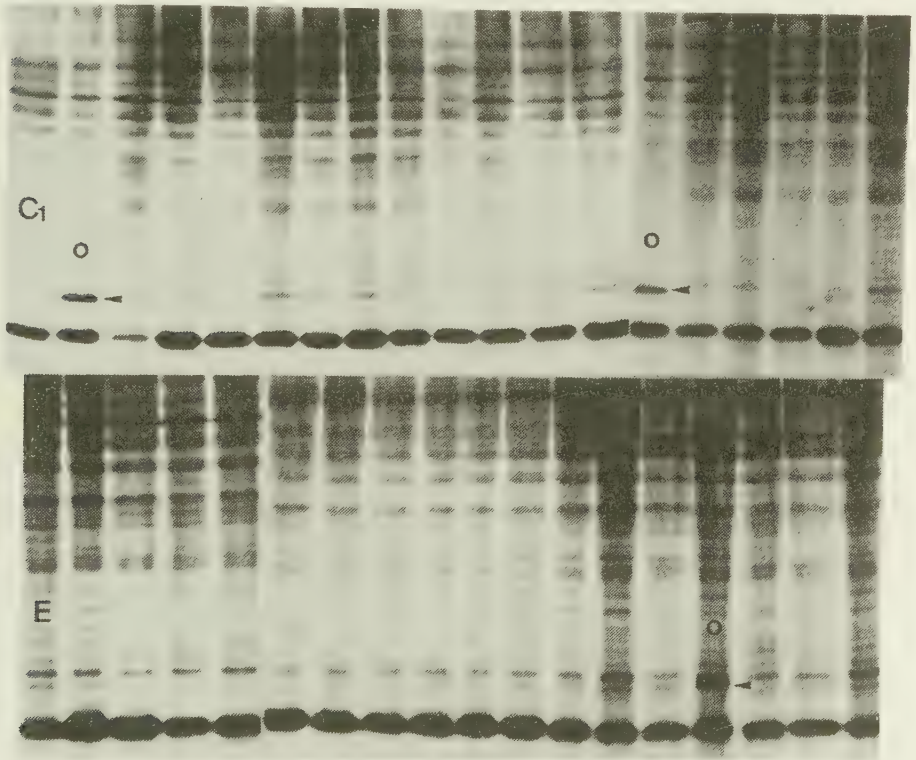


Fig.10: Autoradiogramme [³H]-Histidin-markierter Xenopus Oocyten Proteine nach Injektion von Kaninchen Globin mRNA und Drosophila tRNA Fraktionen (Bsp. RPC-5 Fraktionen C1 und E). In keinem Fall der 230 getesteten Fraktionen konnte opal Nonsensesuppression festgestellt werden. o = Proteinmuster nach opal Suppressor tRNA Injektion, als Referenz (Pfeil bezeichnet das Globin Readthrough Protein, welches bei dem verwendeten Gelsystem zwischen zwei Background Proteinbanden liegt).

Für den amber und ochre Suppressionstest wurden ebenfalls die einzelnen RPC-5 Fraktionen aller Suppressorstämme (adulte tRNA) zusammen mit TMV RNA injiziert (Konzentrationen s.oben, opal-Test). Erstaunlicherweise ergab sich hier pro Genotyp (oder pro RPC-5 Lauf) je mindestens eine stark positive Antwort (Fig. 11).

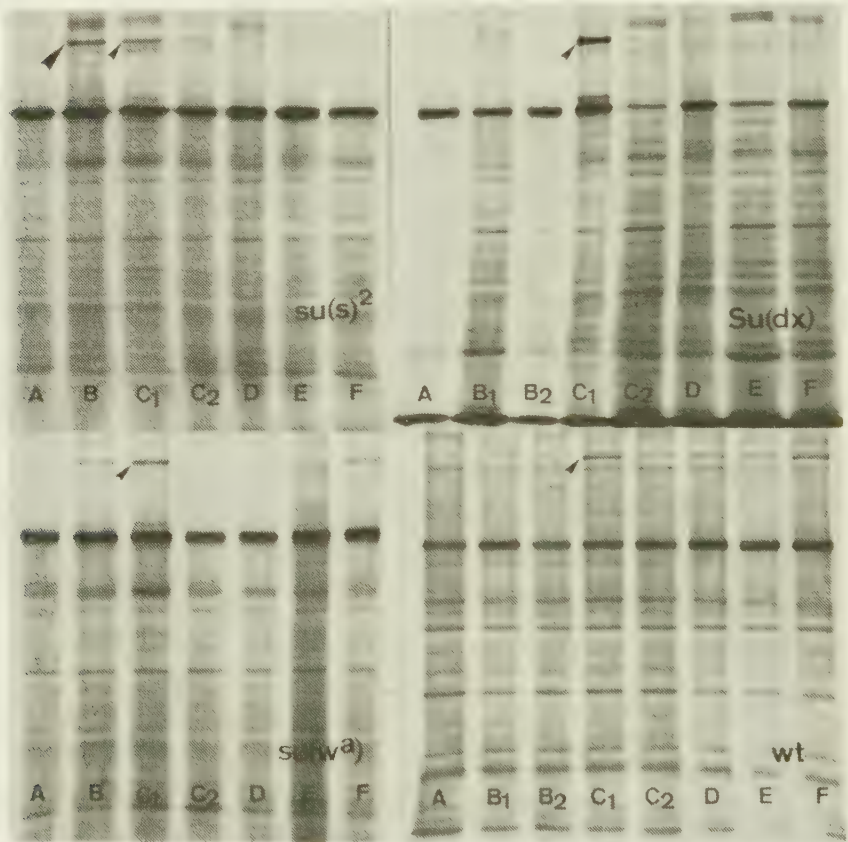


Fig. 11: Autoradiogramme [^{35}S]-Methionin-markierter *Xenopus* Oocyten Proteine nach Injektion von TMV RNA und *Drosophila* tRNA Fraktionen. Es sind vier Beispiele je eines RPC-5 Chromatographielaufs von $su(s)^2$, $Su(dx)$, $su(w^a)$ und vom Wildtyp gezeigt. Das Readthrough Aktivitätsmaximum erscheint immer in der Fraktion C oder C₁, mit Ausnahme von $su(s)^2$ (hier bereits in Fraktion B, Pfeil). Eine Nebenaktivität zeigt sich ausserdem in den Fraktionen E oder F.

Auch die Wiederholung der Teste mit den analogen Wildtypfraktionen ergab dieselbe positive Antwort (Fig. 11). Bei der ersten qualitativen Auswertung erschien es, als ob die C1-Fraktion für die Readthrough Aktivität verantwortlich gemacht werden müsste. Auch bei Fraktionen E und F zeigte sich meist das 160k Protein in leicht verstärktem Ausmass. Diese Befunde legten den Verdacht nahe, dass die Suppressoraktivität der Tyrosin tRNA zugeordnet werden könnte, da die Hauptakzeptoraktivität von Tyrosin in den Fraktionen B2 ($\text{tRNA}_{\text{Q}}^{\text{Tyr}} = \text{tRNA}_{\text{6}}^{\text{Tyr}}$; Grigliatti et al., 1973) und C1 ($\text{tRNA}_{\text{G}}^{\text{Tyr}} = \text{tRNA}_{\text{8}}^{\text{Tyr}}$; Grigliatti et al., 1973), eine Nebenaktivität zudem in Fraktion E oder F ($= \text{tRNA}_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$; bei Grigliatti et al., 1973 nicht gefunden) enthalten ist (Züblin, 1980). Die ersten beiden Codebuchstaben für Tyrosin sind ausserdem dieselben wie für die amber und ochre Terminationstriplets (UAX).

Für die Bekräftigung dieser Hypothese wurde einerseits eine sorgfältige quantitative Auswertung der Injektionsexperimente vorgenommen, indem durch Ausschneiden der 110k und 160k Gelbanden und Radioaktivitätsmessung der prozentuale Anteil des Readthrough Produktes bestimmt wurde. Andererseits wurde die Tyrosin Akzeptoraktivität jeder RPC-5 Fraktion bestimmt. Die Profile für TMV Readthrough- und Tyrosin Akzeptoraktivität sind in Figur 12 für jeden Genotyp dargestellt. Es lassen sich daraus folgende Aussagen und Vermutungen ableiten: i) Die Aktivitätsmaxima der beiden Profile fallen im allgemeinen zusammen und treten meistens in der C1-Fraktion auf. Dieser Befund legt nahe, dass der Hauptisoakzeptor der Tyrosin tRNA, $\text{tRNA}_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$, die erhöhte Synthese des 160k Readthrough Proteins induziert. ii) In derjenigen Fraktion, welche dem Readthrough Aktivitätsmaximum vorangeht, meistens B oder B2, befindet sich stets eine substantielle Tyrosin-Akzeptoraktivität, selten jedoch eine Readthrough Aktivität, die deutlich über der Backgroundschwelle liegt. Die Fraktion B oder B2 enthält den Isoakzeptor $\text{tRNA}_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$, der sich vom Hauptisoakzeptor $\text{tRNA}_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$ nach allen bisherigen Resultaten (White et al., 1973) durch eine hinzukommende Modifikation der ersten Anticodonbase $\text{G} \rightarrow \text{Q}^*$ unterscheidet ($\text{Q} = 7-(4,5\text{-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3-yl-aminomethyl})-7\text{-deazaguanosin}$, $\text{Q}^* = \text{Q-Modifikation}$, welche an der Position 4 des Cyclopentenrings mit einem Zucker, wahrscheinlich Galaktose, glycosyliert ist; Kasai et al., 1975; Okada et al., 1977). Daraus lässt sich die Hypothese formulieren, dass der Q^* -enthal-

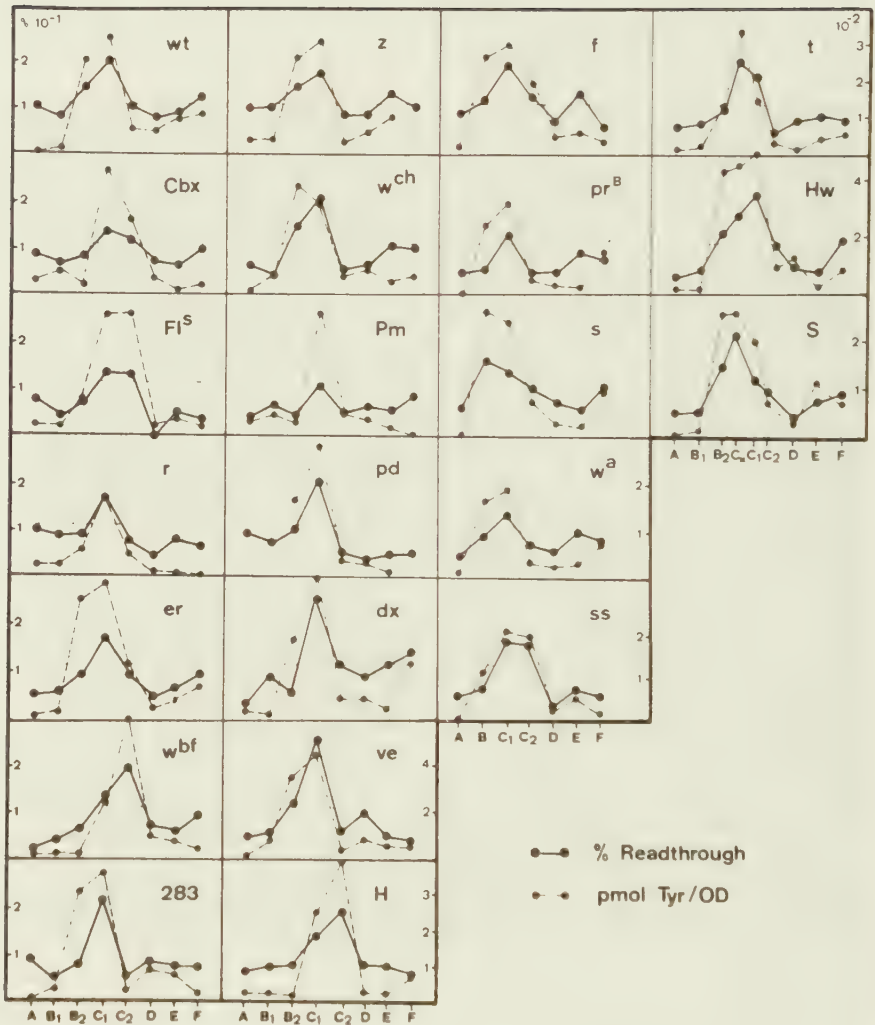


Fig. 12: Readthrough Aktivität und Tyrosin Akzeptoraktivität von RPC-5 tRNA Fraktionen von *Drosophila* Suppressorstämmen (die Bezeichnung "Su" oder "su" ist jeweils weggelassen) und vom Wildtyp (wt) (Backgroundschwelle punktiert eingezeichnet).

tende Tyrosin Isoakzeptor keine Readthrough Aktivität besitzt, aufgrund seiner prominenten Modifikation im Anticodon. iii) Die einzige Fraktion, die deutlich und reproduzierbar Readthrough Aktivität zeigt, obschon sie wenig oder keine $\text{tRNA}_G^{\text{Tyr}}$ enthält, ist die Fraktion B von su(s)². Bei den andern B und C2 Fraktionen, in denen Readthrough Aktivität beobachtet werden kann, scheint es plausibel, dass diese durch einen überlappenden Anteil von $\text{tRNA}_G^{\text{Tyr}}$ verursacht wird. Bei su(s)² erscheint jedoch die Readthrough Aktivität zu früh im Profil - bereits in der zweiten Fraktion - und in stärkerem Ausmass wie in der nächsten $\text{tRNA}_G^{\text{Tyr}}$ -enthaltenden C1 Fraktion. Es kann daher in dieser Fraktion B von su(s)² eine Nonsensesuppressor tRNA vermutet werden. iv) In den Fraktionen E oder/und F überschreitet die Readthrough Aktivität verschiedentlich den oberen Wert der Backgroundschwelle (11%). In diesem Bereich des Profils zeigt sich auch oft wenig, aber signifikante Tyrosin Akzeptoraktivität ($\text{tRNA}_m^{\text{Tyr}}$). Obwohl eine genaue Korrelation dieser beiden Aktivitäten erschwert ist, weil sich die Werte höchstens knapp über dem Background befinden und daher starken artifiziellen Schwankungen unterlegen sind, wird vermutet, dass die Readthrough Aktivität im hinteren Teil des RPC-5 Profils durch den hier eluierenden Nebenisoakzeptor von tRNA^{Tyr} verursacht wird. Diese vier Vermutungen wurden durch Reinigung und erneutes Testen der betreffenden tRNAs geprüft.

5. Tyrosin tRNA im TMV Suppressionstest

Die Reinigung der beiden Tyrosin tRNA Isoakzeptoren erfolgte über eine Sepharose 4B und anschliessende RPC-5 Chromatographie (Fig. 13a). Eindimensionale Gelelektrophorese (10% Gel) zeigte für die $\text{tRNA}_G^{\text{Tyr}}$ -enthaltende RPC-5 Fraktion drei Hauptbanden, von denen die zweite zumindest 95% reine $\text{tRNA}_G^{\text{Tyr}}$ darstellte, für die $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ -enthaltende RPC-Fraktion jedoch vor allem eine Doppelbande, welche nebst $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ einen beträchtlichen Anteil einer Valin tRNA enthielt. In einem zweiten Elektrophoreseschritt (20% Gel) musste daher $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ von der Valin tRNA abgetrennt werden. Damit wurde ein Reinheitsgrad von mindestens 95% erreicht. Die Kriterien für den Reinheitsgrad bestanden ausser der präparativen in einer analytischen Gelelektrophorese unter stark veränderten Bedingungen (15%

Sequenzierungsgel; Stanley and Vassilenko, 1978) von 3'- oder 5'-markierter [^{32}P]-tRNA (M. Altwegg, persönliche Mitteilung). Ein Fingerprint nach pankreatischer RNase Verdauung von [^{125}I]-markierter tRNA $_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$ zeigte nur 10 Fragmente (Dudler, 1981), eine Zahl, welche nur nach Verdauung einer reinen tRNA erhalten wird. Die Beladungswerte sind schlechte Reinheitskriterien (tRNA $_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$ 600 - 800 pmol/OD $_{260}$; tRNA $_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$ 850 pmol/OD $_{260}$), da für verschiedene tRNAs der theoretische Wert von 1600 pmol/OD $_{260}$ nicht erreicht werden kann, vermutlich aufgrund einer Instabilität der betreffenden Synthetasen "in vitro". Relativ betrachtet, können sie trotzdem als Vergleichskriterium des Reinheitsgrades hinzugezogen werden.

Eindimensionale Gelelektrophorese (20% Acrylamid) der RPC-5 Fraktionen E und F zeigte eine schwache Bande (1.2 - 2.5% der gesamten tRNA in diesen beiden Fraktionen) mit einer leicht höheren Mobilität als tRNA $^{\text{Tyr}}$ (Fig. 13b). Tatsächlich konnte diese Bande nach Elution mit Tyrosin aminoacyliert werden (475 pmol/OD $_{260}$); sie enthält demnach mindestens zu 50% den Nebenisoakzeptor tRNA $_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$. Die gleiche Elektrophorese, angewendet für die tRNA $_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$ -enthaltenden Fraktionen eines RPC-5 Profils von su(s)_2^2 tRNA, ergab einen tRNA $_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$ Isoakzeptor, der aufgrund seiner Beladbarkeit als rein betrachtet werden konnte (860 pmol/OD $_{260}$; Fig. 13c).

Die gereinigten Drosophila Tyrosin tRNAs wurden nebst einer reinen Tyrosin tRNA von S.pombe in der Oocyte mit TMV RNA getestet. Hefe tRNA $^{\text{Tyr}}$ (ohne Q-Modifikation; Kasai et al., 1975), sowie die Drosophila tRNA $_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$ und der Nebenisoakzeptor tRNA $_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$ erwiesen sich als aktiv in bezug auf den TMV Readthrough. Für die beiden Hauptisoakzeptoren von Drosophila und Hefe zeigte sich eine ähnliche Dosisabhängigkeit wie für Hefe amber und ochre Suppressor tRNA $^{\text{Tyr}}$ (Fig. 9): bei ca. 2 ng tRNA $^{\text{Tyr}}$ /Oocyte beginnt der Anteil des 160k Readthrough Proteins über die Backgroundschwelle zu steigen, bis sich ein Maximalwert von 57 - 61% bei ca. 40 ng tRNA $^{\text{Tyr}}$ /Oocyte einstellt (Fig. 14). Der Nebenisoakzeptor tRNA $_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$ erwies sich als weniger aktiv als die beiden Hauptisoakzeptoren, ergaben doch 15 ng tRNA $_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$ /Oocyte nur 19% Readthrough Protein. Dennoch kann die bereits erwähnte Readthrough Aktivität der RPC-5 Fraktionen E oder F offensichtlich auf diesen Isoakzeptor tRNA $_{\text{m}}^{\text{Tyr}}$

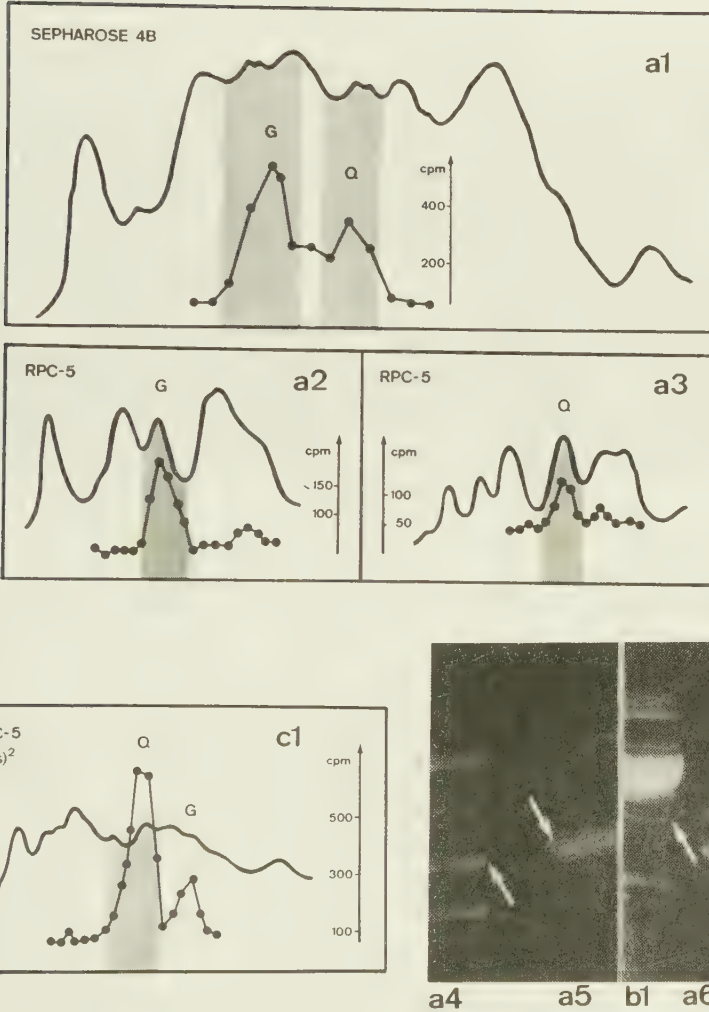


Fig.13: Reinigungsschemen verschiedener *Drosophila* Tyrosin tRNAs. Reinigungsschritte $a1 \rightarrow a2 \rightarrow a4$ führten zu reiner $tRNA_{G}^{Tyr}$ (Pfeil), $a1 \rightarrow a3 \rightarrow a5 \rightarrow a6$ zu reiner $tRNA_{m}^{Tyr}$ (Pfeil). Für die partielle Reinigung von $tRNA_{Q}^{Tyr}$ (Pfeil) wurden RPC-5 Fraktionen E+F (s. Fig.5a) auf einem 20% Gel aufgetrennt (b1). Reinigungsschritte $c1 \rightarrow c2$ führten zu partiell reiner $tRNA_{Q}^{Tyr}$ (Pfeil) von $su(s)^2$.

zurückgeführt werden, denn die andern drei eluierten tRNA-Banden (u.a. vermutlich eine Serin und eine Leucin tRNA enthaltend) zeigten alle nur Backgroundaktivität (4 - 6%, Tabelle 5).

Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Resultaten erwies sich aber die Q*-modifizierte tRNA_Q^{Tyr} als unfähig, die Synthese des 160k Readthrough Proteins signifikant zu induzieren. Teste mit partiell gereinigter tRNA_Q^{Tyr} ergaben in jedem Fall nur Backgroundwerte (7 - 10%), während reine tRNA_Q^{Tyr} bei Injektion von mehr als 40 ng/Oocyte Werte über 11% ergab (maximal 16%). Solche Werte sind beim Vergleich mit denjenigen der Isoakzeptoren ohne Q*-Modifikation vernachlässigbar klein (Fig. 14). Für die Interpretation dieses Resultats muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass ein Teil der injizierten tRNA^{Tyr} durch das endogene Q-Basenmodifikationsenzym verändert wird, was im Falle eines Ersatzes von Q* durch G (Hankins and Farkas, 1970) zu der beobachteten Restaktivität beim Q*-modifizierten Isoakzeptor führt. Die Existenz der Q-Basenmodifikation ist zwar bei *Xenopus laevis* bisher nicht untersucht worden, darf aber angenommen werden, da sie bisher bei allen höheren Eukaryonten gefunden worden ist (Weizenkern; Echino-
dermaten, *Drosophila*, Brachiopoden, Chordaten; Kasai et al., 1975). Es kann demnach aus den obigen Resultaten gefolgert werden, dass die Synthese des 160k Proteins durch die natürlich vorkommende Tyrosin tRNA induziert wird, dass aber die Q*-Modifikation der ersten Anticodonbase von tRNA_Q^{Tyr} diese Induktion verhindert. Der "natürliche" Readthrough bei TMV, welcher in allen bisher untersuchten Systemen in Spuren auftritt, kann somit ganz einfach durch die Präsenz der jeweiligen endogenen Tyrosin tRNA erklärt werden.

Tyrosin tRNA von su(s)² verhielt sich im Suppressionstest jedoch anders. Ueberraschenderweise ergab 10 - 15 ng/Oocyte injizierte, partiell gereinigte tRNA_Q^{Tyr} eine Readthrough Aktivität von 23%. Dieser Wert liegt deutlich über der Backgroundschwelle und ist vergleichbar mit demjenigen, der nach Injektion der gleichen Menge partiell gereinigter tRNA_G^{Tyr} erzielt wird (32%; Tabelle 5). Die Injektion der gereinigten tRNA_Q^{Tyr} von su(s)² bestätigte das Resultat. Bei der Reinigung von tRNA_Q^{Tyr} wurde eine kontaminierende Überlappung von tRNA_G^{Tyr} sorgfältig vermieden (Fig. 13c). Es muss also die Hypothese aufgestellt werden, dass dieser Tyrosin Isoak-

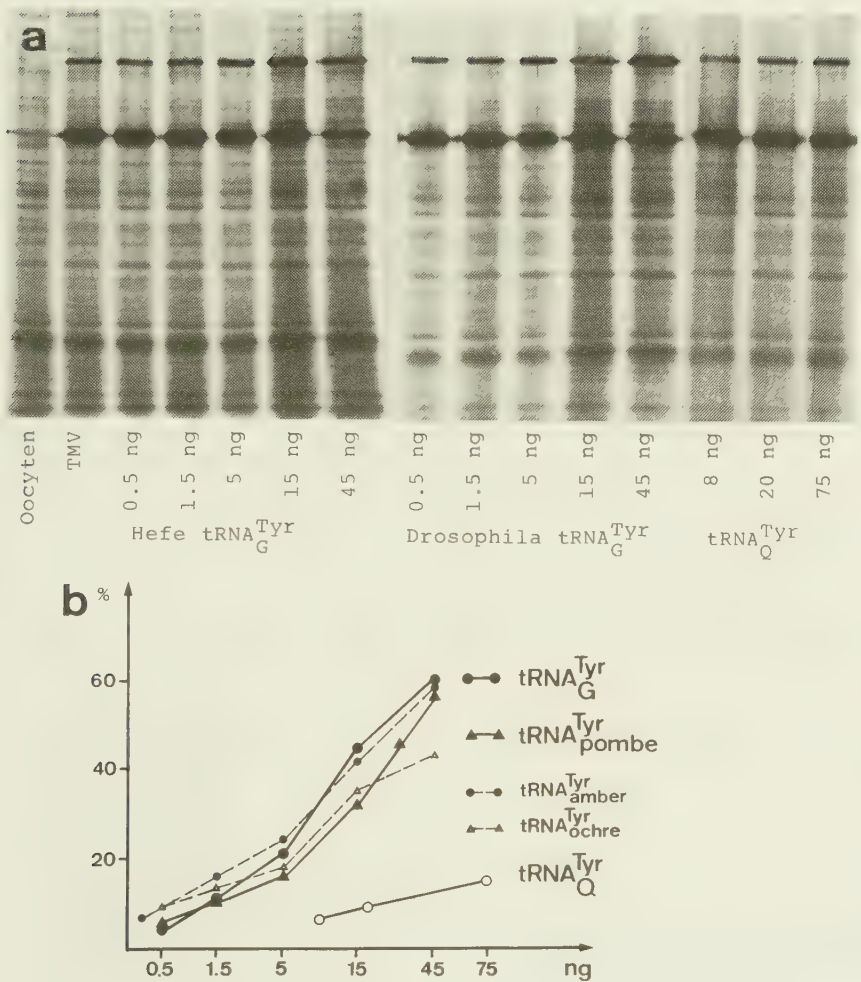


Fig.14: a) Autoradiogramme [^{35}S]-Methionin-markierter *Xenopus* Oocyten Proteine nach Injektion von TMV RNA und verschiedener Konzentrationen reiner Tyrosin tRNA. Hefe und *Drosophila* $tRNA^{Tyr}_G$ zeigen Readthrough Aktivität, während *Drosophila* $tRNA^{Tyr}_Q$ inaktiv ist.

b) Dosisabhängigkeit der Readthrough Aktivität als Funktion der Tyrosin tRNA Konzentration (s. Text zu Fig.9a; die Kurven für amber und ochre Suppressor $tRNA^{Tyr}$ sind zum Vergleich gestrichelt eingezeichnet).

zeptor bei su(s)² so verändert ist, dass er eine ähnliche Readthrough Aktivität wie die tRNA^{Tyr}_G beim Wildtyp erlangt.

In einem letzten Teil soll die Frage beantwortet werden, ob andere reine tRNA Isoakzeptoren, insbesondere tRNA^{Ser} (d.h. die Wildtypform des bereits beschriebenen ochre Suppressors von Hefe), dieselbe Readthrough Aktivität wie die Tyrosin tRNA zeigen. Diese Antwort fiel klar negativ aus: sämtlichen getesteten reinen oder partiell reinen tRNAs (tRNA^{Glu}₄, tRNA^{Val}₄, tRNA^{His}₈, tRNA^{Asp}₈, tRNA^{Asn}₂ und tRNA^{Phe}₂ von Drosophila; 3 tRNA Banden der RPC-Fraktionen E und F, möglicherweise tRNA^{Ser} und tRNA^{Leu} enthaltend; tRNA^{Ser} von Hefe) zeigten höchstens Backgroundaktivität (5 - 11%). Dieses Resultat war aufgrund der RPC-5 Readthrough Aktivitätsprofile zu erwarten; Readthrough Aktivität anderer tRNA Isoakzeptoren hätte sich hier mit grosser Wahrscheinlichkeit bemerkbar auswirken müssen. Hervorzuheben ist das negative Resultat der Wildtyp Serin tRNA von Hefe: es beweist, dass die Readthrough Aktivität im Falle der ochre Suppressor tRNA^{Ser} (s.vorn) auf der Suppressormutation dieser tRNA beruht.

7. Vergleichende Experimente im Retikulozyten "in vitro" System

Als Vergleich zu den qualitativen und quantitativen Resultaten des Oocytensystems wurden die wichtigsten Globin- und TMV-Suppressionsversuche "in vitro" wiederholt. Ochre und opal Suppressor tRNAs wurden mit Kaninchen Globin mRNA, alle Suppressoren mit Xenopus Globin mRNA und TMV RNA, partiell gereinigte und reine Serin und Tyrosin tRNAs von Hefe und Drosophila mit TMV RNA getestet. Pro Ansatz wurde stets 100 ng mRNA und 30 - 300 ng der entsprechenden reinen tRNA zugegeben, gleiche Mengen also, wie sie für einen Ansatz von 20 Oocyten verwendet werden (mit Ausnahme von TMV RNA: bei Verwendung der gleichen Konzentration wie für die Oocyte, d.h. 1 µg pro Ansatz, konnte wegen Ueberlastung des Systems keine Proteinsynthese erhalten werden). Die Resultate sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Es konnte durchwegs festgestellt werden, dass die Effizienz der Readthrough Synthese um einen Faktor 2 - 3 tiefer als in der Oocyte lag. Dies wirkte sich im Fall der opal Suppressionstests

mit Kaninchen Globin mRNA derart aus, dass die minimale Empfindlichkeitsschwelle zwei bis dreifach erhöht war und daher opal Suppression bei Verwendung von Gesamt-tRNA des opal Suppressorstammes von *S.pombe* (25 µg) nicht mehr sicher nachgewiesen werden konnte. Beim Readthrough Test mit TMV RNA erwies es sich aus demselben Grund als schwierig, Suppressionsaktivität für die ochre Suppressor tRNA^{Ser} nachzuweisen (7 - 8%, Backgroundschwelle "in vitro" 5 - 6%).

Auch qualitativ ergaben sich einige Abweichungen von den Resultaten des Oocytensystems. Erfolgreich zeigte sich das "in vitro" System für den Nachweis "echter" ochre Suppression, d.h. Readthrough Aktivität bei sequenzierten UAA Codonen: sowohl das UAA Terminationscodon der Kaninchen α -Globin mRNA, als auch dasjenige der *Xenopus* β - und eventuell α -Globin mRNA konnte mit der Hefe ochre Suppressor tRNA^{Tyr} gelesen werden; dies führte im ersten Fall zur Synthese eines 19k Readthrough Proteins (1%), im zweiten Fall zur Synthese eines 18k Readthrough Proteins (2.4%). Das letztere konnte auch zu 1.5% mit der Hefe ochre Suppressor tRNA^{Ser} erhalten werden (Fig. 15); amber Suppressor tRNA^{Tyr} und opal Suppressor tRNA^{Ser} erwiesen sich in diesem Fall erwartungsgemäss als inaktiv.

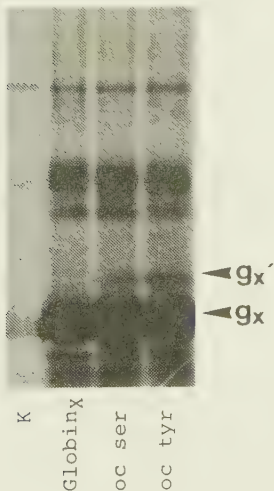


Fig.15: Autoradiogramm [³⁵S]-Methioninmarkierter Proteine nach "in vitro" Translation von *Xenopus* Globin mRNA unter Zugabe von Hefe ochre Suppressor tRNAs (oc tyr, oc ser; K = Kontrolle ohne mRNA; g_x , g_x' = *Xenopus* Globin und zugehöriges Readthrough Protein). Beide ochre Suppressor tRNAs supprimieren das Stopcodon (UAA) von *Xenopus* Globin mRNA zu einem niedrigen Prozentsatz.

Tabelle 5

Zusammenfassung der Readthrough Aktivitäten verschiedener Hefe (H) und Drosophila (D) tRNAs für Kaninchen (K) und Xenopus (X) Globin mRNA und TMV RNA. Vergleich von "in vivo" Xenopus Oocyten- und "in vitro" Retikulozytensystem. Für die Readthrough Prozentangaben, siehe Bemerkung Fig. 9b. Kolonnen 7 und 8 geben eine qualitative Bewertung der Suppressionsaktivität an (-, (+), +, ++, +++, +++++). n = nicht getestet.

mRNA	Stop-Codon	tRNA	ng pro Ansatz*	% Readthrough		Suppression	
				in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
Globin _K	UGA (UAA)	tRNA ^{Ser} _{opal} H	8°	1	n	(+)	n
			24°	2	0.7	+	-
			80°	4	4.0	+	+
			240°	17	6.3	++	+
			800°	44	n	+++	n
			2400°	66	0.1	++++	-
		tRNA ^{Tyr} _{amber} H	crude	1	n	+	-
			40°	0	n	-	-
Globin _X	UAA	tRNA ^{Tyr} _{ochre} H	50°	0	1.0	-	+
		tRNA ^{Ser} _{ochre} H	50°	0	0.5	-	-
		tRNA ^{Tyr} _{amber} H	80°	0	0	-	-
		tRNA ^{Ser} _{opal} H	240°	0	0	-	-
		tRNA ^{Tyr} _{wt} H	500	0	0	-	-
		tRNA ^{Ser} _{wt} H	300	n	0	n	-

Fortsetzung siehe nächste Seite

Tabelle 5 (Fortsetzung)

mRNA	Stop-Codon	tRNA	ng pro Ansatz*	% Readthrough		Suppression	
				in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
TMV	UAG?	-	-	7-11	5-6	"-"	"-"
		tRNA ^{Tyr} _{amber} H	10°	9	n	-	n
			30°	18	n	+	n
			100°	25	n	++	n
			300°	43	20.7	+++	++
			900°	59	n	++++	n
		tRNA ^{Tyr} _{ochre} H	10°	10	n	-	n
			30°	14	n	+	n
			100°	19	n	++	n
			300°	35	16.2	+++	+
			900°	44	n	++++	n
		tRNA ^{Ser} _{ochre} H	3°	11	n	-	n
			10°	12	n	(+)	n
			30°	16	n	+	n
			60°	n	7.2	n	(+)
			100°	20	n	++	n
		tRNA ^{Tyr} _{wt} H	10	6	n	-	n
			30	10	n	-	n
			100	16	16	+	n
			300	32	17.5	++	+
			500	46	n	+++	n
			800	57	n	++++	n
		tRNA ^{Tyr} _G D	10	5	n	-	n
			30	12	n	+	n
			100	22	n	++	n
			300	40	11	+++	+
			900	61	n	++++	n

Fortsetzung siehe nächste Seite

Tabelle 5 (Fortsetzung)

mRNA	Stop-Codon	tRNA		ng pro Ansatz	% Readthrough		Suppression	
					in vivo	in vitro	in vivo	in vitro
TMV	UAG?	tRNA ^{Tyr} _Q	D	150	7	7.1	-	(+)
				300	11	n	-	n
				900	14	n	+	n
				1500	16	n	+	n
		tRNA ^{Tyr} _m	D	300	21	n	++	n
				300	32	n	+++	n
				300	28	n	++	n
				300	7	6.2	-	-
		tRNA ^{Ser} _{wt}	H	300	7	6.2	-	-
				240°	12	14.1	(+)	+

* 1 Ansatz entspricht 20 Oocyten oder 25 µl "in vitro" Assayvolumen.

° Angabe bezieht sich auf den Anteil Suppressor tRNA.

Die erfolgreiche UAA Suppression beruht einerseits darauf, dass α -Globin im homologen und Haemin enthaltenden Retikulozytensystem zu 45% exprimiert werden kann (in der *Xenopus* Oocyte kaum nachweisbar; Resultat gewonnen aufgrund der Analyse mittels sauren Triton-Harnstoffgelen, nicht gezeigt), womit auch ein Readthrough des zugehörigen UAA Terminationscodons möglich wird, andererseits darauf, dass *Xenopus* Globin in einem heterologen System übersetzt wird, was sich scheinbar permissiv bezüglich Readthrough eines Terminationscodons auswirkt. Die positiven Resultate können nicht aufgrund eines fehlenden Backgroundes endogener Proteinsynthese im Retikulozytensystem erklärt werden, denn auch zweidimensionale Gele (O'Farrell et al., 1977) konnten die Globin ochre Readthrough Proteine für das *Xenopus* Oocyten-system nicht nachweisen (Resultat nicht gezeigt). Es muss noch angefügt werden, dass die ochre Readthrough Proteine nur aufgrund ihrer Mobilität im SDS-Gel identifiziert wurden; sie stellen jedoch die wahrscheinlichste Interpretation der Resultate dar.

Ein weiterer qualitativer Unterschied zum "in vivo" System wurde für die Aktivität der opal Suppressor tRNA^{Ser} bezüglich TMV Readthrough festgestellt. Es wurden 14% des 160k Readthrough Proteins beobachtet, was signifikant über der Backgroundschwelle von 5 - 6% liegt. Wildtyp tRNA^{Ser} von Hefe ist hingegen inaktiv (6%). Im übrigen fielen die Versuche im "in vitro" Retikulozyten-system erwartungsgemäss wie im "in vivo" *Xenopus* Oocyten-system aus, abgesehen von der erniedrigten Effizienz.

8. Die Terminationscodonen in einer eukaryontischen Zelle, der *Xenopus laevis* Oocyte

In einer zweiten Anwendung des *Xenopus* Oocytensystems wurde versucht, die Frage zu beantworten, ob in einer eukaryontischen Zelle alle drei Terminationscodonen verwendet werden und in welchem Mass sie vorkommen. Diese Frage scheint zwar durch die zur Zeit 74 bekannten eukaryontischen nukleären mRNA- oder Gensequenzen (Bienz et al., 1981, Appendix) bereits beantwortet zu sein. Es handelt sich in diesen Fällen jedoch ausschliesslich um Sequenzen sehr spezieller Gene oder mRNAs (Globin-, Hormon-, Histongene), dazu meist um die homologen Gene oder mRNAs ver-

schiedener Organismen (fast 20% aller Sequenzen betreffen Globin). Diese nach ganz besonderen Kriterien ausgewählte "Stichprobe" darf daher kaum als repräsentativ für die Verhältnisse einer wenig differenzierten Zelle wie der Oocyte betrachtet werden.

Die biologische Aktivität der Hefe Suppressoren in der Xenopus Oocyte wurde bereits in den vorangehenden Versuchen mittels koinjizierter Messenger RNAs nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass sich die Suppressionsaktivität auch in der endogenen Proteinsynthese der Oocyte auswirkt. Konsequenterweise müsste man für jedes genügend effiziente Suppressionereignis eine Änderung im Muster der synthetisierten Oocytenproteine erwarten; mit anderen Worten, jede suppressorspezifisch induzierte Musterveränderung steht für die Existenz eines entsprechenden Terminationscodons auf der zugehörigen Oocyten mRNA. Solche Musterveränderungen können mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert werden, und ihre jeweilige Anzahl pro Suppressortyp kann als Mass für die relative Häufigkeit des entsprechenden Terminationscodons interpretiert werden.

Somit ist der Versuchsansatz gegeben: alle drei Hefe Suppressor tRNAs, tRNA^{Ser}_{opal}, tRNA^{Tyr}_{ochre}, tRNA^{Tyr}_{amber}, wurden einzeln und in Kombination von zweien in je zehn Oocyten injiziert. Die Suppressor Konzentration (5 - 15 ng/Oocyte) wurde so gewählt, dass sie bei gleichzeitiger Injektion einer Test-mRNA ein klar beobachtbares Readthrough Produkt ermöglichte. Sie entspricht 12 - 40% der Gesamt-tRNA Konzentration einer Oocyte (Gatica et al., 1975). Die entstehenden Proteine wurden mit [³⁵S]-Methionin während zwanzig Stunden radioaktiv markiert und nach Extraktion zweidimensional aufgetrennt (O'Farrell, 1975). Die Autoradiogramme wurden miteinander verglichen, und die Musteränderungen in bezug auf dasselbe Kontrollgel (= Proteinmuster nicht injizierter Oocyten) aufgezeichnet. Es wurde unterschieden zwischen starken Änderungen, d.h. neuerscheinenden starken Flecken oder deutlicher Abnahme vorhandener starker Flecken, und schwachen Änderungen, d.h. neuerscheinenden oder verschwindenden schwachen Flecken; keine Unterscheidung wurde getroffen bezüglich Neuerscheinen oder Verschwinden eines Fleckens, da beide Typen von Musteränderungen durch ein Readthrough Ereignis verursacht werden können. Ein ver-

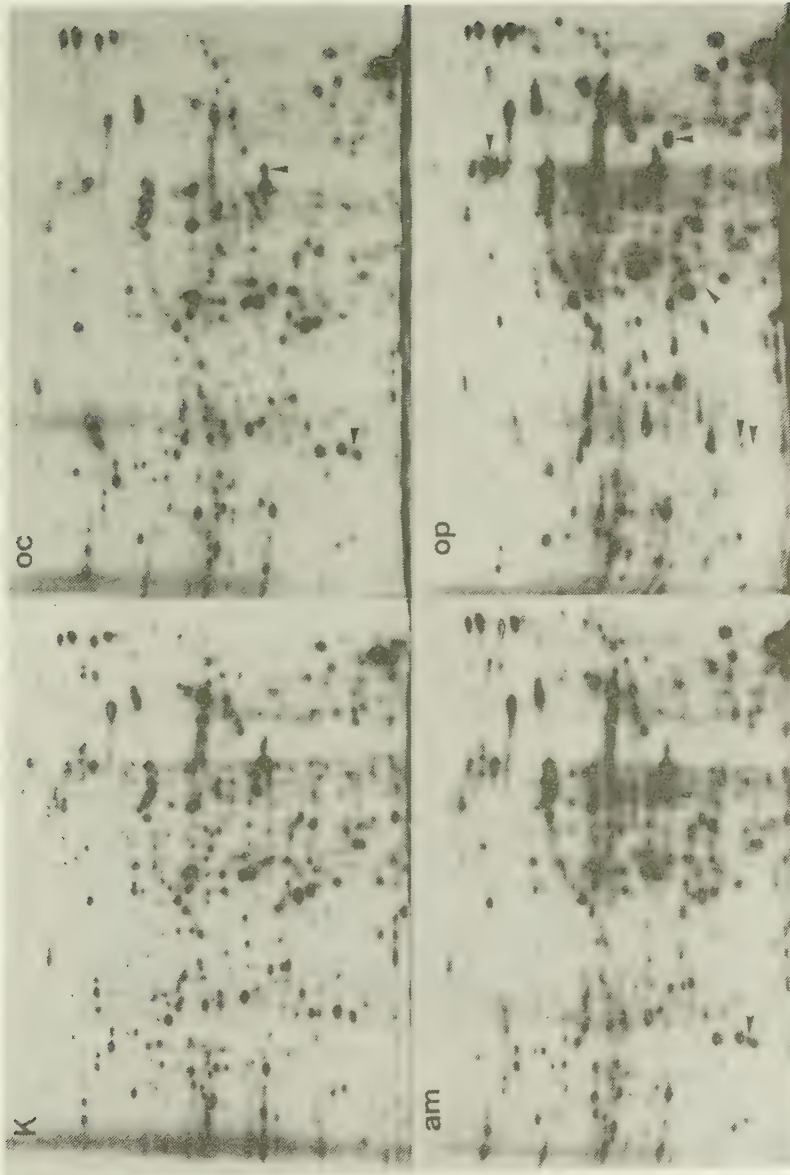
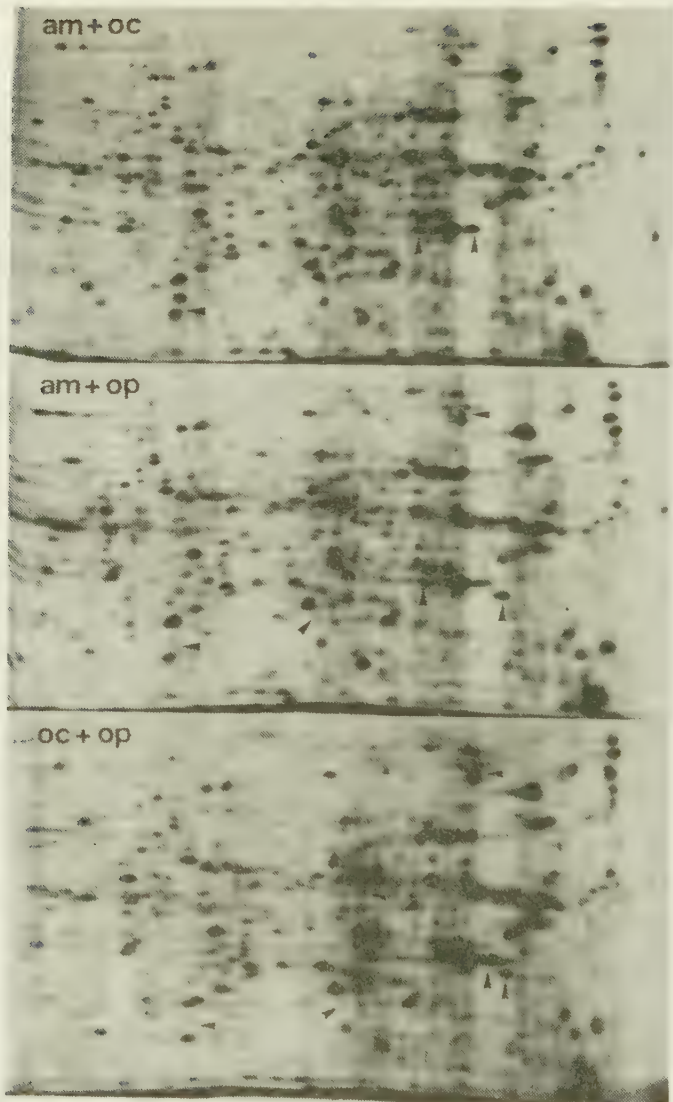


Fig. 1b: Autoradiogramme [^{35}S]-Methionin-markierter Xenopus Oocytenproteine nach Injektion von HeLa Suppressor tRNAs (am = amber, oc = ochre, op = opal, K = nicht injizierte Kontrolle). Pfeile bezeichnen die deutlichsten Suppressor-induzierten Veränderungen.



11.1.17: Autoradiogramme [^{35}S]-Methionin-markierter Xenopus Oocytenproteine nach Injektion je zweier verschiedener Hefe Suppressor tRNAs (am = amber, oc = ochre, op = opal). Pfeile bezeichnen die stärksten Suppressor-induzierten Veränderungen.

längertes Protein muss sich in einer geladenen Aminosäure, bzw. in 5 - 15 ungeladenen Aminosäuren vom ursprünglichen Protein unterscheiden, um in der ersten, bzw. zweiten Dimension der Gelelektrophorese entdeckt werden zu können. Als weitere Kontrollen wurden die Proteinmuster von Oocyten hinzugezogen, welche mit Salzlösung, Phenylalanin oder Tryptophan tRNA (5 ng/Oocyte) von Hefe injiziert worden waren. Für einen zusätzlichen Vergleich wurde auch tRNA^{Ser}_{ochre} von *S.pombe* injiziert (2.5 ng/Oocyte).

Bereits oberflächliche Vergleiche der zweidimensionalen Gele zeigten suppressorspezifische Unterschiede in den Proteinmustern (Fig. 16 und 17; gut erkennbare Unterschiede sind mit Pfeilen markiert). Mehrfach wiederholte, sorgfältige Analysen ergaben für die tRNA^{Tyr}_{amber} 51, für die tRNA^{Tyr}_{ochre} 53 und für tRNA^{Ser}_{opal} 78 Aenderungen (Fig. 18). Diese Werte übertreffen deutlich diejenigen, welche nach Injektion von Tryptophan oder Phenylalanin tRNA (beide ca. 20 vorwiegend schwache Aenderungen) oder Salzlösung (3 schwache Aenderungen) induziert werden. Das

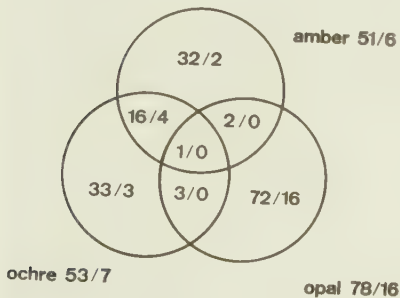


Fig.18:

Vennndiagramm zur Darstellung der quantitativen Effekte von Hefe Suppressor tRNAs auf die *Xenopus* Oocyten Proteinsynthese. Die Anzahl Suppressor-induzierter Veränderungen (totale Anzahl vor dem Strich, starke Veränderungen hinter dem Strich) ist für die einzelnen Suppressortypen gegeben.

Vennndiagramm in Figur 18 veranschaulicht des weiteren, dass nur amber und ochre Suppressor tRNA dieselben Aenderungen bewirken können (16 + 1); die andern drei Schnittmengen sind annähernd leer (2 + 1, 3 + 1, 1 Unterschiede). Dieser Befund dient als weitere interne Kontrolle: nur amber und ochre Suppressor tRNAs dürfen dieselben Terminationscodonen lesen können, gemäss den Wobble Regeln (Crick, 1966). Vergleiche der Musterveränderungen

nach tRNA^{Ser}_{ochre} und tRNA^{Tyr}_{ochre} Injektion zeigten eine Uebereinstimmung von 60%; insbesondere lassen sich alle augenfälligen, ochre-typischen Aenderungen der Tyrosin tRNA bei der Serin tRNA wieder finden, obschon die letztere als "in vivo" ineffizient beschrieben ist (Hawthorne und Leupold, 1974). Die weitgehende Uebereinstimmung beider Muster weist darauf hin, dass die gefundenen Aenderungen des Proteinmusters nicht durch die Spezies oder Effizienz einer tRNA, sondern durch ihr Anticodon bedingt sind. Generell kann aus den obigen Resultaten geschlossen werden, dass alle drei Terminationscodonen in den Messenger RNAs der Oocyte enthalten sind.

Paarweise Injektionen von je zwei Suppressor tRNAs verschiedener Spezifität erhöhte den Effekt bezüglich Proteinmusteränderungen beträchtlich. Amber und ochre Suppressor tRNAs ergaben bei Koinjektion 58, amber und opal 107, ochre und opal 73 Aenderungen (Tabelle 6). Dabei stimmten nur je rund 40% der Aenderungen mit denjenigen der entsprechenden Einzelinjektionen überein, d.h. mehr als die Hälfte der Aenderungen waren spezifisch für die jeweilige Kombination zweier verschiedener Suppressor tRNAs. Diese spezifischen Aenderungen müssen zum grössten Teil durch zwei konsekutive Readthrough Ereignisse zweier direkt hintereinanderliegenden oder mit Abstand sich folgenden Terminationscodonen verursacht sein.

Tabelle 6

Effekt zweier gleichzeitig injizierter Suppressor tRNAs. Die Zahl in Klammern bedeutet starke suppressorinduzierte Aenderungen des Proteinsynthesemusters und ist in der Zahl vor den Klammern enthalten, welche die total induzierten Aenderungen angibt.

Suppressortyp	Total beobachtete Aenderungen	Spezifische Aenderungen (d.h. nicht beobachtbar bei den betr. Einzelinjektionen)
amber + ochre	58 (20)	33 (9)
amber + opal	107 (38)	66 (19)
ochre + opal	73 (33)	41 (19)

DISKUSSION

Suppression wurde als Modellsystem für das Studium von Gen-Phän Reaktionsketten gewählt. Der experimentelle Ansatz bestand darin, morphologisch und genetisch beschriebene Suppressormutanten von *Drosophila melanogaster* molekular zu untersuchen. Eine detaillierte Analyse der Transfer RNA dieser Mutanten wurde deshalb als sinnvoll betrachtet, weil Suppression bei niederen Organismen häufig in mutierten tRNA Molekülen begründet liegt und weil ausserdem die Identifikation einer tRNA-abhängigen Nonsense-suppressormutante von grossem instrumentellem Wert wäre, wie dies in der Einleitung bereits dargelegt wurde. Der beschrittene Ansatz ist zur Zeit der einzig mögliche; für den alternativen experimentellen Ansatz, der bei einer Nonsensemutation und der Selektion von deren Suppressoren beginnt, fehlen bei *Drosophila* die Voraussetzungen.

1. Screening- und Testsysteme für den Nachweis einer *Drosophila* Suppressor tRNA

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei grundsätzlich verschiedene Lösungswege für das Auffinden von *Drosophila* Suppressor tRNAs eingeschlagen: Analyse von Gesamt-tRNA mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese für die Entdeckung von Musterabnormitäten und Entwicklung eines Testsystems für den direkten Nachweis von tRNA-abhängiger Nonsense Suppressoraktivität. Beim ersten Lösungsweg wurde zudem die Analyse von ribosomalen Proteinen eingeschlossen. Die beiden sich ergänzenden Untersuchungsmethoden sollten bei genügender Sensitivität die Detektion einer Suppressor tRNA ermöglichen.

Hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von 68 - 69 ribosomalen Proteinen oder 80 - 100 verschiedenen tRNA Isoakzeptoren (40 - 50 stark und 40 - 50 schwach vertretene Isoakzeptoren), mit anderen Worten, es handelt sich bei den anfärbbaren Flecken meist um reine Moleküle. Da die Methode in beiden Fällen partiell denaturierend wirkt, er-

laubt sie insbesondere auch die Auftrennung von feinen Konformationsunterschieden. Beispielsweise kann *Drosophila* Phenylalanin tRNA aufgrund einer partiellen Modifikation im Anticodon- oder Extraloop in zwei Flecken aufgetrennt werden (Altwegg und Kubli, 1979). Ausserdem gelang es bei Hefe, unter verschiedenen Cycloheximid-resistenten Stämmen in einem Fall ein ribosomales Protein mit veränderten Migrationseigenschaften im zweidimensionalen Gel zu entdecken (Coddington und Flury, 1977). Aufgrund solcher Resultate erscheint die Möglichkeit gegeben, nebst Molekulargewichtsunterschieden auch Veränderungen in den Modifikationen, für tRNA sogar eventuell Substitutionen wichtiger Nukleotide aufzufinden. Nachdem aber Basenmodifikationen sich wiederholt als entscheidend wichtig für den Codon-Anticodonerkennungsprozess herausgestellt haben (Grosjean et al., 1978) und zudem ein Fall von Nonsense-suppression, beruhend auf einer fehlenden Methylierung, bekannt ist (Pope et al., 1978), erscheint es als sinnvoll, ein Screening für tRNA- und ribosomale Proteinmutanten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese durchzuführen. Dieses fiel allerdings für ribosomale Proteine von 7 verschiedenen Suppressorstämmen negativ aus. Insbesondere liessen sich bei su(f) keine Abweichungen vom Wildtyp feststellen (in Uebereinstimmung mit Lambertsson, 1975, und Vaslet und Berger, 1976), obwohl mehrfach vermutet und behauptet worden war, dass su(f) für ein ribosomales Protein codiere (Dudick et al., 1973; Finnerty et al., 1973; Steffensen, 1973). Die tRNA Mustervergleiche hingegen ergaben eine stammspezifische Variante, ein Befund, der im nächsten Kapitel eingehend besprochen werden soll.

Während die Methoden der hochauflösenden Gelelektrophorese bereits bekannt und für ähnliche Zwecke angewendet worden waren (Lambertsson, 1975; Coddington und Flury, 1977; Piper und Wasserstein, 1977), musste ein geeignetes Testsystem für den Nachweis von Nonsense-suppression zuerst gesucht und ausgearbeitet werden. Zwar sind verschiedene "in vitro" Testsysteme für Nonsense-suppression beschrieben worden (Capecchi et al., 1975; Gesteland et al., 1976; Kohli et al., 1979); diese haben aber immer den Nachteil einer niedrigen Effizienz und sind zudem artefaktanfällig (siehe

Seite 55). Beispielsweise konnte in einem "in vitro" System nie Nonsense-suppression gesichert nachgewiesen werden, wenn Gesamt-tRNA getestet wurde; es musste daher immer partiell gereinigte tRNA verwendet werden (Capecchi et al., 1975; Gesteland et al., 1976; Kohli et al., 1979). Und wenn sich auch Hefe tRNA in diesen "in vitro" Systemen als aktiv erwies, konnte nicht von vornherein angenommen werden, dass auch die tRNA eines höheren Eukaryonten wie *Drosophila*, namentlich die schwach vertretenen Nebenisoacceptoren, biologische Aktivität zeigen würde. Aus solchen Überlegungen wurde ein "in vivo" System gesucht, das die fremde zu testende tRNA in seine eigene Proteinsynthese einzubeziehen vermag, möglichst optimale Aminoacylierungsbedingungen aufweist und ausserdem gegen verfälschende Einflüsse wie Ionen- oder Polyaminkonzentrationen maximal gepuffert ist.

In einem ersten Schritt wurde eine Zelle gesucht, die eine Nonsensemutation enthielt und deren supprimiertes Protein-Produkt einfach nachweisbar war. Nur eine einzige Zelllinie eines höheren Organismus kam in Frage, da sie durch Sequenzierung nachgewiesener Massen eine "ochre" Mutation (de facto eine Frameshift Mutation, welche nach wenigen Codonen zu einem verfrühten ochre Terminationscodon führt) enthält: die IF3 Linie von Maus Myelomazellen (MOPC 21; Secher et al., 1979). Die Methode der PEG-induzierten Fusion tRNA-beladener RBC-Ghosts mit den Testzellen bot die Möglichkeit an, genügend tRNA in die Myelomazellen hineinzubringen, so dass nach einigen Stunden immer noch 0.25 - 0.5 pg intakte Suppressor tRNA pro Zelle vorhanden war. Mit vergleichbaren Konzentrationen konnte in der Oocyte Suppressoraktivität nachgewiesen werden (s. Seite 54). Es war jedoch nicht möglich, durch Zugabe von Hefe ochre Suppressor tRNA das Readthrough Protein der mutierten schweren Immunoglobulinketten mRNA weder in der Zelle drin noch unter den sezernierten Proteinen zu entdecken, obwohl diese Suppression "in vitro" an isolierter mRNA gelungen war (Secher et al., 1979). Diese Resultate lassen sich auf drei verschiedene Arten erklären:

- i) Die Transfereffizienz war zu niedrig, so dass zu wenig tRNA für eine erfolgreiche Suppression in die Zelle hineingelangte.
- ii) Die hochspezialisierten und zudem transformierten Myelomazellen sind nicht fähig, eine heterologe tRNA in ihren Protein-

syntheseapparat einzubeziehen. iii) UAA Codonen sind gut gegen Readthrough geschützt (dafür sprechen die Resultate der Globin Readthroughs).

Vermutlich treffen alle drei Erklärungen bis zu einem gewissen Grad zu, was sich in der Kombination negativ für einen Suppressionserfolg auswirkt. Es muss noch erwähnt werden, dass nach der Anwendung einer analogen Methode ohne Suppression einer HGPRT Nonsensemutation berichtet worden ist (Capecci et al., 1977); die Daten in diesem Fall sind jedoch zweifelhaft, und das Resultat muss mit Vorsicht angesehen werden.

Nach diesen Erfahrungen wurde eine Zelle gewählt, welche weniger spezialisiert ist und welche einen hocheffizienten Transfer von exogenen Makromolekülen durch Mikroinjektion erlaubt und zudem diese Makromoleküle für ihre eigene Proteinsynthese benutzen kann: die *Xenopus laevis* Oocyte. Es konnte ein sensitiver Suppressionstest ausgearbeitet werden, der nur kleine Mengen von mRNA und tRNA benötigt. Für einen deutlich sichtbaren Readthrough des UGA Terminationscodons der Kaninchen β -Globin mRNA wird 1 ng opal Suppressor tRNA^{Ser} pro Oocyte benötigt; mit der gleichen Konzentration von amber oder ochre Suppressor tRNA^{Tyr} oder ochre tRNA^{Ser} kann ein deutlich signifikanter Prozentsatz des Readthrough Proteins 160k für Tabak Mosaik Virus RNA erhalten werden.

Bemerkenswert ist das Resultat, dass alle vier Suppressor tRNAs in beiden Systemen ungefähr die gleiche Empfindlichkeitsschwelle aufweisen, obwohl die Suppressormutante sup3-1 (enthalt ochre tRNA^{Ser}) als "in vivo" ineffizient beschrieben ist (Hawthorne und Leopold, 1974). Amber Suppressor tRNA^{Tyr} scheint allerdings bezüglich TMV Readthrough am aktivsten zu sein.

Vergleiche mit den analogen Experimenten in einem "in vitro" proteinsynthetisierenden System, beruhend auf einem Retikulozytenextrakt, zeigten durchwegs einen Faktor 2 - 3, um den die Readthrough Aktivität "in vitro" geringer als "in vivo" war. Dieser Faktor wirkte sich in zwei Fällen kritisch aus: Readthrough Aktivität konnte "in vitro" nicht nachgewiesen werden, wenn Gesamt-tRNA vom UGA-Suppressorstamm sup3-e verwendet wurde, und konnte nur unsicher nachgewiesen werden, wenn ochre tRNA^{Ser} beim vorlie-

genden Reinheitsgrad von 2.5% getestet wurde. Das *Xenopus* Oocyten System stellt daher zur Zeit das sensitivste und effizienteste Testsystem für Nonsensesuppression dar. Es kann auch mit grosser Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass *Drosophila* tRNA von der *Xenopus* Oocyte aminoacyliert und für die Proteinsynthese verwendet werden kann wie die endogene tRNA, da sich tRNA Sequenzen höherer Eukaryonten jeweils nur in wenigen Basensubstitutionen unterscheiden (Sprinzl et al., 1980). Diese Annahme wurde für die Tyrosin tRNA von *Drosophila* auch bewiesen.

Als weiterer Vorteil des *Xenopus* Oocyten Systems muss seine Unempfindlichkeit gegen Artefakte erwähnt werden. Im Gegensatz zu "in vitro" Experimenten konnte das 160k Readthrough Protein für TMV RNA nicht mit erhöhten Magnesiumkonzentrationen (Pelham, 1978) oder Polyaminzugabe (Morch et al., 1980) induziert werden. Die Oocyte ist offenbar fähig, ihr Ionengleichgewicht trotz grosser Mengen zugefügter Ionen aufrechtzuerhalten. Auch zeigte die opal Suppressor tRNA^{Ser} im TMV Test nur "in vitro" Readthrough Aktivität. Diese Aktivität ist insofern artifiziell, als sie mit einer Art "two out of three" (Lagerkvist, 1978) Codon-Anticodon Interaktion erklärt werden muss: wenn man für TMV ein UAA Terminationscodon annimmt (siehe Seite 62), könnte das Anticodon eines opal Suppressors mit der ersten und dritten Base des UAA Codons paaren. Eine solche Interaktion, welche ein A-C Paar in der mittleren Codonposition involviert, scheint allerdings ziemlich instabil zu sein (Grosjean et al., 1978). Jedenfalls wird sie von der Oocyte "in vivo" nicht zugelassen.

Zu den beiden erwähnten Vorteilen des *Xenopus* Oocytensystems kommt die Tatsache, dass *Xenopus* Oocyten sehr einfach zu handhaben und jederzeit erhältlich sind, so dass umfängliche Testversuche mit grossen Serien von tRNA Fraktionen mit vernünftigem Aufwand durchführbar sind. Es konnten daher auch insgesamt 230 *Drosophila* tRNA Fraktionen von 21 verschiedenen Suppressorstämmen auf Globin oder TMV Readthrough Aktivität getestet werden. Die erhaltenen Resultate sollen in einem späteren Abschnitt diskutiert werden.

Die Entwicklung eines homologen *Drosophila* Testsystems wurde angestrebt, weniger wegen grundsätzlicher Vorteile gegenüber einem heterologen System, sondern damit der arbeitsintensive Teil der

tRNA Probenaufbereitung umgangen werden könnte. Dank diesem letzteren Vorteil wäre ein solches System anwendbar für ein Screening von Hunderten von potentiellen Nonsensesuppressoren. Allerdings müsste es in der technischen Ausführung einfach handhabbar sein, eine Vorbedingung, welche die Übertragung des beschriebenen *Xenopus* Oocytensystems auf *Drosophila* Oocyten oder Eier nicht erlaubt. Es wurden daher Vorversuche für experimentelle Ansätze durchgeführt, welche keine Nadelinjektion delikater *Drosophila* Eier oder Oocyten erfordern: i) Injektion von Makromolekülen in Abdomina adulter Weibchen, unter der Annahme (basierend auf Resultaten über die Verhältnisse bei anderen Insekten (Telfer, 1961)), dass solche Moleküle gleichzeitig mit den Vitellogeninen von den Oocyten selbst aufgenommen würden. ii) Verwendung zellfreier, proteinsynthetisierender Extrakte von *Drosophila* Embryonen. iii) Fusion von *Drosophila* Zellen (aus embryonalen Primärkulturen oder Zelllinien) mit Säugerblutzellen, welche durch osmotischen Schock entleert und mit den erwünschten Makromolekülen (tRNA) beladen werden können. Alle drei Arten von Vorversuchen gelangen nicht, im ersten Fall vermutlich aus prinzipiellen Gründen. Weitere Vorarbeit in Richtung der letzteren beiden Ansätze müsste geleistet werden, damit ein homologes, genügend sensitives *Drosophila* Testsystem für Nonsensesuppression erarbeitet werden könnte.

2. Die $Su(dx)$ -spezifische Arginin tRNA

Die zweidimensionale Gelelektrophorese zeigte im Falle von vier Mutanten, $Su(dx)$, $su(pd)$, $su(ve)$ und $Su(w^{ch})$, einen zusätzlichen Flecken in der Region der langsam migrierenden tRNAs. Dieser wurde bei $Su(dx)$ durch Aminoacylierung als Arginin tRNA identifiziert (Züblin, 1980). Es kann sich dabei entweder um das Produkt eines mutierten tRNA Gens oder um einen Modifikationsunterschied handeln. Der prozentuale Anteil dieser tRNA (0.1 - 0.2% der Gesamt-tRNA) schliesst die erste Möglichkeit nicht aus. Genetische Experimente zeigten einerseits, dass die Genome von $Su(dx)$, $su(ve)$, und $su(pd)$ einen supprimierenden Einfluss auf die Expressivität von *deltex* haben (besonders ausgeprägt bei $Su(dx)$), während

andere Genome einen solchen Effekt nicht aufweisen (Su(w^{ch}), su(t), Wildtyp), und andererseits, dass die Ursache des zusätzlichen RNA Fleckens bei Su(dx), su(pd), Su(w^{ch}) und wahrscheinlich su(ve) auf dem zweiten Chromosom lokalisiert ist, in seiner Wirkung ausser bei Su(w^{ch}) stets dominant ist und bei Su(dx) einen Dosis-effekt aufweist. Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese formuliert, dass die Suppression von *deltex* auf einer mutanten Arginin tRNA beruht. Die Hypothese beinhaltet auch die Annahme, dass die mutante Arginin tRNA auf die Mutation Su(dx) zurückzuführen ist, da die Ursache dieser tRNA mit der Mutation Su(dx) bezüglich mehrerer Charakteristika (Lokalisation, Dominanz, Dosis-effekt) korrelierbar ist; bei den andern drei Mutanten müsste die Ursache des RNA Fleckens nicht auf der jeweiligen Suppressormutation beruhen, sondern kann unabhängig davon auf dem zweiten Chromosom als "stille" Mutation enthalten sein (su(pd) und su(ve) sind auf dem dritten Chromosom lokalisiert).

Diese Hypothese wurde in zweierlei Hinsicht geprüft: die mutante tRNA^{Arg} wurde auf Nonsensesuppressoraktivität getestet und die Mutation Su(dx) wurde zwecks Korrelation mit der Ursache für die mutante tRNA^{Arg} genauer auf dem zweiten Chromosom zu lokalisieren versucht. Obwohl eine Arginin tRNA in einer Einschnittmutation zu einer opal Suppressor tRNA mutieren kann, fielen beide Suppressionsteste negativ aus. Im Falle des Globintestes wurde ein mögliches Readthrough Protein auch mittels zweidimensionaler Gelanalyse nicht gefunden. Die Möglichkeit eines Nonsensesuppressionsmechanismus bei Su(dx) muss daher mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Für die Lokalisation von Su(dx) liegen erst vorläufige Resultate vor. Demnach kann die obige Hypothese beibehalten werden, wobei die Su(dx) spezifische tRNA^{Arg} als genetisch bedingte Variante eines Wildtyp Isoakzeptors bezeichnet werden kann. Abschliessend soll noch hervorgehoben werden, dass diese stammspezifische tRNA wie eine Suppressor tRNA genetisch und cytologisch lokalisierbar ist, woraus ein bereits besprochener instrumenteller Wert für die weitere Forschung erwächst.

3. Drosophila tRNA im Nonsensesuppressionstest

Mit dem *Xenopus* Oocyten System wurde ein sensitiver "in vivo" Test für den Nachweis aller drei Typen von Nonsensesuppression (amber, ochre, opal) geschaffen. Ferner wurde tRNA von 21 verschiedenen Suppressorstämmen von *Drosophila* mittels Säulenchromatographie vorfraktioniert, womit ein durchschnittlicher Reinigungsfaktor von 5 - 15 für die einzelnen Isoakzeptoren erzielt wurde. Unter der Annahme, dass alle tRNA Gene mit einer ähnlichen Rate "in vivo" transkribiert werden, d.h. jedes der rund 1200 tRNA Gene (Weber und Berger, 1976) ungefähr 0.08% zur Gesamt-tRNA Menge beiträgt, kann berechnet werden, dass eine potentielle Suppressor tRNA als Produkt eines einzigen mutierten Gens in den verwendeten Testfraktionen zu 5 - 8 ng pro Oocyte enthalten sein muss. Dieser Wert liegt aber 5 - 8-fach über dem minimalen Schwellenwert von 1 ng tRNA pro Oocyte, welcher für alle vier Hefe Suppressor tRNAs festgestellt worden ist. Sollte eine solche Suppressor tRNA nicht vom klassischen Typ einer Anticodonsequenzmutante sein, sondern z.B. eine Änderung in der Basenmodifikation im oder neben dem Anticodon erfahren haben, so könnte ein Faktor 5 - 8 in ihrer Aktivität eingebüsst werden, damit diese im Oocytentest noch erfassbar wäre. Gesamthaft kann also festgestellt werden, dass eine *Drosophila* Suppressor tRNA im *Xenopus* Oocytentest mit grosser Wahrscheinlichkeit entdeckt werden muss und dass die negative Evidenz im opal Suppressionstest bedeutet, dass sich unter den getesteten tRNAs keine opal Suppressor tRNA befindet.

Etwas anders muss die Schlussfolgerung für die TMV Teste lauten. Die Tatsache, dass Wildtyp Tyrosin tRNA in diesem Test Readthrough Aktivität zeigt, bringt einerseits den Beweis, dass *Drosophila* tRNA in der Oocyte mindestens so aktiv ist wie Hefe tRNA, schränkt aber die Aussagekraft der amber und ochre Teste ein. Der TMV Suppressionstest vermag nur Aktivität derjenigen tRNAs zu entdecken, welche nicht mit tRNA_G^{Tyr} auf RPC-5 kochromatographieren (Fraktion C1). Auch bei den spät eluierenden tRNAs könnte eine amber oder ochre Suppressoraktivität durch die Readthrough Aktivität des Tyrosin Nebenisoakzeptors überdeckt werden. Dieser

Nebenisoakzeptor, welcher 1 - 2% der RPC-5 Fraktion und 0.1 - 0.2% der Gesamt-tRNA ausmacht, d.h. das Produkt eines einzelnen Gens darstellen könnte, beweist wiederum, dass Suppressionsaktivität für das Produkt eines einzelnen Gens nachweisbar ist, denn sie wurde in fast jedem Fall der getesteten Genotypen festgestellt. Es kann daher ausgesagt werden, dass in den Fraktionen A, B1 und D keine amber oder ochre Suppressor tRNAs im Falle der 21 getesteten Genotypen enthalten sind und dass in den Fraktionen B2, C2 und E bzw. F wahrscheinlich keine Suppressoren vorhanden sind. Eine Ausnahme bildet su(s)².

Suppressor of sable, su(s)², ist eine rezessive Mutation, lokalisiert am Ende des X-Chromosoms (1-0.0), und supprimiert gewisse Allele von v (v^s, v^u = unsupprimierbare Allele; Green, 1952), s, pr und sp (Lindsley und Grell, 1967). Diese Mutante zeigt reproduzierbar einen erhöhten Anteil des Q*-Basen modifizierten Tyrosin Isoakzeptors (Twardzik et al., 1971), was ursprünglich zur Hypothese Anlass gegeben hat (White et al., 1973), dass der unmodifizierte Tyrosin Isoakzeptor mit dem Suppressionsmechanismus bei su(s)² in kausalem Zusammenhang stehe, konkreter, dass durch das (teilweise) Fehlen dieses Isoakzeptors die durch Mutation veränderte Tryptophanpyrrolase von v nicht mehr inhibiert werden könne und daher partielle Enzymaktivität zurückerhalte (Jacobson, 1971; Jacobson et al., 1975). Die Rolle von tRNA^{Tyr}_Q als Enzyminhibitor konnte jedoch nicht bestätigt werden (Mischke et al., 1975), und obwohl eine gewisse Korrelation zwischen relativer Verteilung der beiden Tyrosin Isoakzeptoren und dem Ausmass der Expressivität von v festgestellt wurde (Jacobson, 1978), bleibt die Rolle der Tyrosin Isoakzeptoren für die Suppressionswirkung bei su(s)² unklar. Die Verteilung der beiden Isoakzeptoren ist nämlich auch von Zuchtbedingungen (Futterzusammensetzung, Temperatur; Wosnick und White, 1977) und vom Alter (Hosbach und Kubli, 1979), d.h. vermutlich vom allgemeinen physiologischen Zustand der Fliegen abhängig.

Der TMV Suppressionstest der su(s)² tRNA Fraktionen zeigte reproduzierbar, dass das Maximum der Readthrough Aktivität der Fraktion B zugeordnet werden kann und dass das Aktivitätsprofil genau mit dem Tyrosinakzeptorprofil koinzidierte. Durch Reinigung

des in B eluierenden Isoakzeptors $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ konnte bestätigt werden, dass die Readthrough Aktivität in diesem Isoakzeptor begründet liegt. Da aber die Q*-modifizierte Tyrosin tRNA des Wildtyps keine solche Aktivität zeigt, muss die Hypothese aufgestellt werden, dass $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ von su(s)^2 durch Mutation verändert ist und daher Suppressionsaktivität erhält. Da die Natur des TMV Stopcodons nicht aufgeklärt ist (siehe Seite 61), kann nicht vorausgesagt werden, welcher Art die Mutation bei der su(s)^2 Tyrosin tRNA ist. Grundsätzlich kann es sich um eine Mutation in einem Tyrosin tRNA Strukturgen oder um einen Unterschied in der Basenmodifikation von $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ handeln. Im ersten Fall wäre 5 - 10% der gesamten Tyrosin tRNA von su(s)^2 mutiert - *Drosophila melanogaster* besitzt 10 - 20 Gene für Tyrosin tRNA (Dudler, 1981) - d.h. "reine" $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ von su(s)^2 wäre de facto heterogen und enthielte nebst dem normalen das mutierte Molekül. Dieses hätte mit grosser Wahrscheinlichkeit eine Q* $\rightarrow$ C oder eine Q* $\rightarrow$ U Basensubstitution an der Wobbleposition des Anticodons (= amber oder ochre Suppressor tRNA). Gegen diese Möglichkeit sprechen die Tatsachen, dass beim su(s)^2 Locus keine Tyrosin tRNA Gene lokalisierbar sind (T.Schmidt, persönliche Mitteilung), dass die TMV Readthrough Aktivität nicht von der Tyrosin Akzeptoraktivität abtrennbar ist (Suter und Bienz, nicht publiziert) und dass die Readthrough Aktivität zu hoch erscheint, als dass sie durch 5 - 10% der getesteten $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ verursacht werden könnte. Im zweiten Fall läge die Mutation in einem Modifikationsenzymgen, wodurch $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ von su(s)^2 so verändert würde, dass die inhibierende Wirkung der Q-Basenmodifikation (siehe nächstes Kapitel) kompensiert würde. Eine solche Veränderung in der Basenmodifikation von su(s)^2 $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ ist von Jacobson et al. (1975) bereits postuliert worden. Vorläufige Sequenzierungsergebnisse zeigen keinen Unterschied zwischen $\text{tRNA}_Q^{\text{Tyr}}$ von su(s)^2 und Wildtyp; insbesondere konnte die Q*-Basenmodifikation bei su(s)^2 an der ersten Position des Anticodons nachgewiesen werden (B.Suter, F.Meier und M.Altwegg, persönliche Mitteilung).

4. Tyrosin tRNA und TMV Readthrough Aktivität

Tabak Mosaik Virus enthält eine RNA von ungefähr 6kb Länge, welche für mindestens vier Genprodukte codiert (Hunter et al., 1976). Die beiden Gene am 3' Ende sind vermutlich durch Duplikation auseinanderhervorgegangen, wobei das distale Gen für das Hüllprotein codiert, das mehr innen gelegene Gen den Initiationspunkt (Haarnadelschleife) für die Assoziation der Hüllproteine enthält, während am 5' Ende ein grosses Stück RNA für das 110k Protein und in seiner Verlängerung auch für das 160k Protein codiert (Hunter et al., 1976; Zimmern, 1977). Die Funktion der letzteren Proteine kann nur vermutet werden (virale Replikation); es sind die einzigen Genprodukte, die in proteinsynthetisierenden Systemen erhalten werden können, das 160k Protein jedoch nur zu einem niedrigen Prozentsatz (Sakai und Takebe, 1972; Knowland, 1974; Bruening et al., 1976; Morch und Benicourt, 1980). Durch Peptidanalyse wurde festgestellt, dass das 110k Protein mit dem NH₂-Ende des 160k Proteins identisch ist; und durch Zugabe von amber oder ochre Suppressor tRNAs konnte der Anteil des 160k Proteins stark erhöht werden, zwei Versuchsergebnisse, welche darauf schliessen liessen, dass das 160k Protein durch einen Readthrough eines UAG (amber) Terminationscodons am Ende des 110k Gens entsteht (Pelham, 1978). Die Readthrough Aktivität der ochre Suppressor tRNA wurde mit den Wobble Regeln erklärt (Pelham, 1978).

Aufgrund der obigen Arbeit wurde TMV RNA für den amber und ochre Suppressionstest verwendet. Es stellte sich aber heraus, dass nicht nur amber und ochre Suppressor tRNAs zu einer Induktion des 160k Readthrough Proteins fähig waren, sondern auch Wildtyp tRNA^{Tyr} von Hefe und Drosophila. Im letzteren Fall zeigte allerdings der Q*-modifizierte Isoakzeptor keine Readthrough Aktivität. Diese Resultate erfordern ein neues Ueberdenken der Situation bei TMV. Es ist bereits erwähnt worden, dass sich TMV RNA jedenfalls nicht für den Nachweis von Suppressoraktivität einer Tyrosin tRNA (Ausnahme Q*-modifizierte tRNA^{Tyr}_Q) anwenden lässt. In dieser Arbeit wurde diese Aktivität für die ochre Suppressor tRNA^{Tyr} mit

Xenopus Globin mRNA nachgewiesen, für die amber Suppressor tRNA^{Tyr} nur indirekt erschlossen (Dosisabhängigkeitskurve beim TMV Read-through, Verhalten in bezug auf endogene mRNA der Oocyte).

Die Hypothese, dass ein UAG (amber) Codon die Translation des 110K Proteins terminiert (Pelham, 1978), kann weiterhin aufrechterhalten werden, obwohl auch eine alternative Hypothese aufgestellt werden kann, dass es sich nämlich bei dem betreffenden Codon um ein Tyrosin codon (UA^C_U) handeln könnte. Folgende Resultate sprechen für die erste Hypothese: i) Es handelt sich grundsätzlich um ein Terminationscodon, weil die Translation im Normalfall in 90 - 95% an dieser Stelle abbricht. Ein amber Codon stellt die wahrscheinlichste Möglichkeit dar, ii) weil es von amber und ochre Suppressor tRNAs (tRNA^{Tyr} und tRNA^{Ser}_{ochre}, diese Arbeit; tRNA^{Ser}_{amber}, Morsch and Benicourt, 1980) und von Wildtyp Tyrosin tRNA gelesen werden kann (erste zwei Codonbuchstaben müssen daher UA heissen; schliesst opal, UGA, aus), iii) weil amber tRNA eine leicht höhere Readthrough Aktivität als ochre tRNA zeigt (siehe auch Pelham, 1978).

Ein weiteres Argument für ein amber Codon stammt aus der Literatur: ein Misreading von amber Codonen durch Hefe Tyrosin tRNA wurde im Fall von synthetischer mRNA und von einer Q β amber Mutante bereits beobachtet, nicht aber im Fall einer Q β ochre Mutante (Heckman, 1975). Für ein ochre Codon hingegen sprechen der Befund, dass "in vitro" eine Readthrough Aktivität von opal Suppressor tRNA^{Ser} beobachtet worden ist (das opal Codon ist in zwei Buchstaben mit dem ochre, nur in einem mit dem amber Codon übereinstimmend), und die Ueberlegung, dass gemäss Wobble Regeln (Crick, 1966; Grosjean et al., 1978) ein A (nicht aber ein G) in der dritten Codonposition (Wobble Position) von einem G gelesen werden kann. Trotz diesen z.T. sehr starken Argumenten für ein Terminationscodon bietet sich eine Schwierigkeit: die Readthrough Aktivität der Wildtyp Tyrosin tRNA muss erklärt werden. Zunächst können diese Resultate den natürlichen Readthrough, der bisher in allen Systemen in einem ähnlichen Ausmass beobachtet worden ist, auf einfache Art erklären - man braucht dazu nicht mehr natürlich vorkommende Suppressor tRNAs zu postulieren, sondern kann normale Tyrosin tRNA dafür verantwortlich machen. Wenn aber die Hypothese

des amber Codons akzeptiert wird, ergibt sich konsequenterweise eine G - G (für ein ochre eine A - G) Paarung an der dritten Position des Codons. Eine solche Basenpaarung wurde aber aufgrund sterisch-geometrischer Ueberlegungen und Berechnungen mit den Wobble Regeln "verboten" (Crick, 1966). Eine andere Hypothese (two out of three reading, Lagerkvist, 1978) besagt jedoch, dass eine Decodierung, beruhend allein auf den ersten beiden Codonbuchstaben, wahrscheinlich wird, wenn die Interaktion dieser beiden Basenpaare genügend stark ist (z.B. G - C). Evidenz für eine solche "two out of three" Decodierung besteht in Resultaten von Versuchen mit Glycin, Valin und Leucin tRNAs, die jedoch stets "in vitro" gewonnen wurden (Bergquist et al., 1968; Mitra et al., 1977; Weissenbach et al., 1977). Der Decodierungsprozess "in vivo" scheint hingegen streng gemäss Watson-Crick Basenpaarung aller drei Codonbuchstaben zu erfolgen (J.Kohli und E.J.Murgola, persönliche Mitteilungen). Bei den Resultaten in dieser Arbeit handelt es sich aber um eine "in vivo" Situation; die Aktivität der Tyrosin tRNA kann nicht als Artefakt abgetan werden, denn das Oocytensystem hat sich in jeder geprüften Hinsicht als nicht anfällig gegenüber Artefakten erwiesen. Zudem ist die Readthrough Aktivität von Tyrosin tRNA offensichtlich nicht auf heterologe Systeme beschränkt, denn das 160k Readthrough Protein wird auch in infizierten Pflanzenzellen gefunden (Sakai et al., 1972; Bruening et al., 1976). Es ist aber durchaus denkbar, dass die TMV RNA einen Spezialfall darstellt, weil bei dieser viralen genomischen RNA aus ökonomischen Gründen eine Genüberlappung und entsprechend eine Regulation der Expression der beiden Gene evoluiert worden ist. Solche Fälle sind bei Viren mehrfach entdeckt worden (Weiner und Weber, 1971; Yates et al., 1977; Philipson et al., 1978; Engelberg-Kulka et al., 1979), und für den Bakteriophagen Q β ist der Nachweis einer Genregulation mittels einer Tryptophan tRNA überzeugend gelungen: ein "leaky" UGA Terminationscodon am Ende des Coatproteingens erlaubt einen Readthrough durch tRNA^{Trp} und damit die Synthese eines für Infektivität notwendigen Readthrough Proteins (Weiner und Weber, 1971). Die Eigenschaft "leaky" kann durch die Sekundärstruktur der RNA erklärt werden, wie sie beispielsweise bei TMV

beobachtet worden ist (Zimmern, 1977); strukturelle Bedingungen also, welche möglicherweise das Terminationscodon so exponieren, dass ein Misreading an der dritten Codonposition möglich wird. Modifikation des Terminationscodons oder des Tyrosin tRNA Anticodons könnte ein solches Misreading begünstigen, wenn sie stabilisierend auf die Codon-Anticodon Interaktion an den ersten beiden Codonpositionen wirken. Dieser Mechanismus ist daher besonders wahrscheinlich, weil die eukaryontische Tyrosin tRNA (Hefe, *Drosophila*) als einzige von 135 sequenzierten tRNAs eine Modifikation (ψ) in der mittleren Anticodonposition trägt (Sprinzl et al., 1980; F.Meier und M.Altwegg, persönliche Mitteilung). Mehr als die Hälfte aller tRNAs sind an der ersten (Wobble) Position, keine jedoch an der dritten Anticodonposition modifiziert. Während Modifikation an der Wobble Position ein Misreading verhindert und die Codon-Anticodoninteraktion einschränkt (Grosjean und Chantrenne, 1981; siehe Seite 66), kann Modifikation an den anderen beiden Positionen aufgrund der gleichen Ueberlegungen ein Misreading begünstigen.

Aehnliche Erklärungsmöglichkeiten wie Sekundärstruktur und Basenmodifikation müssen hinzugezogen werden, wenn die Hypothese des Tyrosincodons am Ende des 110k Proteins aufrechterhalten werden soll. Allerdings müssten in diesem Fall Sekundärstruktur und Basenmodifikationen eine Elongation der Proteinsynthese in 90 - 95% verhindern können, was sehr unwahrscheinlich erscheint. Das Phänomen des "Pausing", d.h. des teilweisen Verweilens des Ribosoms an bestimmten Stellen der mRNA, ist bei Prokaryonten beobachtet worden und kann für das verfrühte Abbrechen der Proteinsynthese an bevorzugten Stellen der mRNA und damit für das Auftreten diskreter, prämaturer Proteinbanden verantwortlich gemacht werden (Manley, 1978). Dennoch bleibt diese Erklärung für den TMV Read-through unplausibel, weil das Terminationseignis 10 - 20 mal häufiger als das Elongationseignis auftritt. Auch kann bei der Hypothese des Tyrosincodons schlecht verstanden werden, warum eine amber oder leuchte Suppressor tRNA^{ser} den Anteil des Readthrough Proteins stark erhöhen sollte, denn es würde auch in diesem Fall eine ungewöhnliche Basenpaarung benötigt (C - U, U - C, C - C, U - U; einzig U - U Basenpaarungen scheinen möglich zu sein; Grosjean et al., 1978).

Eine dritte Erklärungsmöglichkeit für den tRNA^{Tyr} -bedingten Readthrough bei TMV muss aus ähnlichen Gründen ausgeschlossen werden, nämlich diejenige, dass der Readthrough durch ein Ausser-Phase-Geraten des Ribosom-tRNA-Komplexes bedingt wird (Atkins et al., 1979). Von den vier Möglichkeiten des Ausser-Phase-Geratsens (-2, -1, +1, +2) kann nur die unwahrscheinlichste (-2) zur Entstehung eines Tyrosincodons führen, wenn dem Terminationscodon (UXX) ein Leucin-, Isoleucin- oder Serincodon (XUA) vorausgeht. Es ist aber schwer zu verstehen, dass in beiden Phasen der Translation dasselbe Readthrough Protein entstehen könnte: das Tyrosin tRNA- und das Suppressor tRNA-induzierte Readthrough Produkt sind aufgrund ihrer Mobilität im SDS-Gel identisch.

Abschliessend kann festgestellt werden, dass es zwar Einwände gegen die Existenz eines Terminationscodons am Ende des 110k Proteingens gibt, vor allem die dadurch benötigte G - G oder G - A Basenpaarung betreffend, dass aber dennoch die Existenz eines amber oder ochre Codons die weitaus wahrscheinlichste Erklärungsmöglichkeit für alle experimentellen Resultate darstellt. Sollte ein amber oder ochre Codon durch Sequenzanalyse bestätigt werden, so stellt das Tyrosin tRNA-induzierte 160k Readthrough Protein das erste "in vivo" Beispiel für einen "two out of three" Decodierungsmechanismus bei Eukaryonten dar. Auch könnte es neben Q β als weiteres gesichertes Beispiel für eine Genexpressionskontrolle im Sinne einer Modulation bei der Termination der Translation angeführt werden.

Es bleibt in einem letzten Abschnitt zu diskutieren, wie die Resultate der Drosophila Tyrosin tRNA Isoakzeptoren zu interpretieren sind. Nach der bisherigen Annahme besteht der einzige strukturelle Unterschied zwischen den beiden Hauptisoakzeptoren von tRNA^{Tyr} in einer einzigen Modifikation, welche die erste Anticodonbase G in Q* überführt (White et al., 1973). Vorläufige Sequenzierungsergebnisse bestätigen diese Annahme (F.Meier und M.Altwegg, persönliche Mitteilung). Offensichtlich lässt sich hingegen ein frappanter Unterschied in der Funktion der beiden Isoakzeptoren nachweisen: $\text{tRNA}_{\text{Q}}^{\text{Tyr}}$ zeigt höchstens spurenhafte Readthrough Aktivität im TMV-Test, während $\text{tRNA}_{\text{G}}^{\text{Tyr}}$ mindestens so aktiv wie Hefe

amber und ochre Suppressor tRNAs ist. Höchstwahrscheinlich ist tRNA^{Tyr}_Q sogar total inaktiv, denn die Restaktivität kann vermutlich auf eine Konversion von tRNA^{Tyr}_Q in tRNA^{Tyr}_G durch das *Xenopus* Modifikationsenzym zurückgeführt werden (McKinnon et al., 1978). Sollten die weiteren Sequenzierungsergebnisse die isogenische Herkunft der beiden Isoakzeptoren bestätigen, so müsste der drastische Unterschied in der Aktivität auf die Q*-Basenmodifikation zurückgeführt werden. Grosjean et al. (1978) konnten mit Temperatursprungexperimenten nachweisen, dass die Substitution von G durch Q in der ersten Anticodonposition die Anticodon-Anticodoninteraktion um einen Faktor 3 verstärkt. Diese Stabilisierung wirkt sich offensichtlich positiv auf die Genauigkeit des Decodierungsprozesses aus: die Erkennungsfähigkeit von tRNA^{Tyr}_Q wird auf die "kognaten" Tyrosin Codonen (UAA, UAC) eingeschränkt. Analoge Befunde, meistens auf "in vitro" Versuchen beruhend, werden von Nishimura (1979) besprochen. Es ist denkbar, dass TMV-infizierte Zellen vom Aktivitätsunterschied der Tyrosin tRNA Isoakzeptoren Gebrauch machen: wenn solche Zellen den Hauptteil ihrer Tyrosin tRNA mit dem Q*-Enzym modifizieren (wie dies bei transformierten Zellen und alten *Drosophila* Männchen beobachtet worden ist; Katze, 1975; Hosbach und Kubli, 1979), können sie die Produktion des 160k Proteins herabsetzen und damit möglicherweise die Infektivität des Virus verringern oder verhindern. Eine solche Regulation der Genexpression auf Translationsebene kann in diesem Fall experimentell geprüft werden.

5. Termination der Proteinsynthese bei Eukaryonten

Bisher konnten nur Vermutungen und Hypothesen über die relative Verteilung, die Bedeutung und Funktion der drei Terminationscodonen bei Eukaryonten aufgestellt werden, da dieses Problem nicht systematisch erforscht werden ist. Die bekannten Sequenzen von eukaryontischen Genen und mRNAs können nur einen beschränkten Teil zur Lösung dieses Problems beitragen, da diese Stichprobe eine extreme Auswahl von Genen und mRNAs mit in grossen Mengen synthetisierten, dazugehörigen Proteinprodukten darstellt und daher nicht

von vornherein als repräsentativ angesehen werden kann (Bienz et al., 1981, Appendix). Es haben sich aber aufgrund verschiedener experimenteller Ansätze Ideen über die Bedeutung der Terminationscodonen herausgebildet. Bei Prokaryonten besteht die Auffassung, dass UAA (ochre) das hauptsächlich vorkommende Stopcodon ist, begründet in der niedrigen "in vivo" Effizienz und den verheerenden Auswirkungen der ochre Suppressoren (Brenner und Beckwith, 1965). Bei eukaryontischen Zellen scheinen vor allem amber Codonen "leaky" zu sein, d.h. einen bestimmten Prozentsatz Readthrough zu erlauben, wie das bei einer amber Nonsensemutante von Herpes Viren festgestellt worden ist (Cremer et al., 1979) und für TMV und MuLV Viren möglicherweise sogar eine Bedingung für Infektivität ist (Pelham, 1978; Philipson et al., 1978). "Leaky" ist auch das opal Terminationscodon von Kaninchen β -Globin bezeichnet worden, weil hier gelegentlich Readthrough durch eine Tryptophan tRNA erfolgt (Geller und Rich, 1980). Aufgrund dieser Befunde ist von Geller und Rich (1980) die Hypothese aufgestellt worden, dass bei Eukaryonten UAA immer Stop, UAG und UGA meistens Stop bedeuten. Bei den letzteren Experimenten ist allerdings der Verdacht gerechtfertigt, dass diese Readthrough Aktivität in einer kontaminierenden mitochondrialen Tryptophan tRNA begründet ist, welche natürlicherweise ein UGA-kognates Anticodon besitzt (Barrell et al., 1979; Li und Tzagoloff, 1979). UGA spezifiziert in den Mitochondrien Tryptophan; hier treten nur UAG und UAA als Terminationscodonen auf (Macino et al., 1979).

In dieser Arbeit wurde durch Injektion von Suppressor tRNAs in die *Xenopus* Oocyte versucht, die relative Verteilung der drei Terminationscodonen quantitativ zu erfassen. Diese Untersuchung umfasste ungefähr 600 aktiv translatierte Messenger RNAs und bezog sich auf das Suppressor-induzierte Auftreten von Readthrough Proteinen oder generell auf Änderungen im Proteinsynthesemuster, welches mit zweidimensionaler Gelelektrophorese analysiert wurde. Die drei wichtigsten Resultate sollen hier diskutiert werden:

- i) opal Suppressor tRNA zeigte deutlich den stärksten Effekt auf die *Xenopus* Oocytenproteinsynthese.
- ii) Es wurde allgemein eine geringe Readthrough Aktivität festgestellt.
- iii) Injektion zweier

Suppressor tRNAs gleichzeitig ergab einen ungleich viel stärkeren Effekt als Injektion einer einzigen Suppressor tRNA.

Der deutliche Einfluss der opal Suppressor tRNA^{Ser} kann nicht mit dem Reinheitsgrad oder mit der hohen Effizienz dieser tRNA erklärt werden, da sich bei den Readthrough Versuchen mit injizierten mRNAs herausgestellt hatte, dass der Reinheitsgrad für die Readthrough Effizienz keine Rolle spielt und dass die Empfindlichkeitsschwelle für Detektion von Readthrough Aktivität für alle Suppressor tRNAs ungefähr gleich ist. Hingegen kann aus diesem Resultat geschlossen werden, dass entweder die UGA Codonen häufiger als die beiden Terminationscodonen vorkommen oder dass UGA Codonen weniger gut gegen Readthrough geschützt sind. Letztere Folgerung wird durch Beobachtungen bei den Globin Readthrough Experimenten gestützt; hier zeigte sich der Readthrough von UAA Codonen erschwert im Vergleich zu demjenigen des UGA Codons (siehe Resultate). In diesem Licht der Interpretation kann auch der schwache Effekt der ochre Suppressor tRNAs auf die Oocytenproteinsynthese gesehen werden, der dann offensichtlich wird, wenn die mit amber gemeinsamen Veränderungen den Wobble Regeln gemäss amber Codonen zugeschrieben werden.

Die generell niedrige Readthrough Effizienz bei diesem Experiment (maximal 26%) muss darauf zurückgeführt werden, dass eine Suppressor tRNA mit den endogenen Terminationsfaktoren kompetitiert. Diese Faktoren machen einen beträchtlichen Prozentsatz des zellulären Proteins aus (C.T.Caskey, persönliche Mitteilung). Kontexteinflüsse benachbarter Nukleotide der mRNA auf die Suppressioneffizienz sind mehrfach überzeugend beschrieben worden (Feinstein und Altman, 1978; Bossi und Roth, 1980). Auch wurde bei einer Analyse der bekannten Gen- und mRNA-Sequenzen festgestellt, dass der Kontext bei den natürlichen Terminationscodonen (bei Eukaryonten) nicht zufällig lautet (Bienz et al., 1981, Appendix). Es ist daher denkbar, dass die Terminationsfaktoren eines Organismus auf die spezifischen Terminationscodonenkontexte abgestimmt sind, wodurch die Aktivität einer exogenen Suppressor tRNA abgeschwächt würde. Aus demselben Grund wäre verständlich, warum in der Xenopus Oocyte kein Readthrough des Terminationscodons von Xenopus Globin mRNA erhalten werden kann. Als alternative Erklärungsmöglichkeit für die niedrige Readthrough Effizienz muss erwähnt werden, dass

fehlerhafte Proteine (z.B. durch Readthrough verlängerte Proteine) von Zellen erkannt und rasch abgebaut werden können.

Gleichzeitige Injektion zweier verschiedener Suppressor tRNAs hat einen deutlich erhöhten Effekt auf die Oocytenproteinsynthese im Vergleich zu den Injektionen einzelner Suppressor tRNAs. Mehr als die Hälfte der induzierten Veränderungen können bei den Einzelinjektionen nicht wiedergefunden werden, müssen daher als spezifisch für die jeweilige Kombination zweier Suppressor tRNAs bezeichnet werden. In dieser Menge der spezifischen Veränderungen sind diejenigen Readthrough Ereignisse enthalten, welche zwei direkt oder indirekt hintereinanderliegende Terminationscodonen betreffen. Der verhältnismässig hohe Prozentsatz solcher Doppelreadthrough Ereignisse könnte darauf hindeuten, dass das jeweilige Folgestopcodon gegen Readthrough weniger geschützt ist als das eigentliche Stopcodon. Dieses Resultat wird durch die Analyse der bekannten Gen- und mRNA-Sequenzen von Eukaryonten gestützt (Bienz et al., 1981, Appendix). Folgestopcodonen weisen völlig zufällig lautende Nukleotidkontexte auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der *Xenopus* Oocyte alle drei Terminationscodonen in vergleichbarem Ausmass bei aktiv translatierten mRNAs verwendet werden. Der beschriebene Versuchsansatz kann im übrigen auch dazu verwendet werden, eine Suppressoraktivität ohne gleichzeitige Injektion von exogener mRNA nachzuweisen; obwohl bei Fröschen allgemein ein ausgeprägter Polymorphismus herrscht und das zweidimensionale Proteinmuster zweier *Xenopus* Individuen daher grosse Unterschiede aufweist (Resultate nicht gezeigt), können doch die suppressorspezifischen Markerunterschiede stets festgestellt werden. Eine Uebertragung des Systems auf andere Organismen unter der Annahme, dass die deutlichen suppressorspezifischen Markerflecken in der Aktinregion wiedergefunden werden können (Aktin ist ein sehr konservatives Protein!), scheint jedoch nicht so einfach zu sein: erste Versuche mit einem opal Suppressorstamm von Hefe haben den prominenten opal-spezifischen Flecken in der Aktinregion auf einem zweidimensionalen Gel nicht gezeigt (J.Kohli, persönliche Mitteilung).

EXPERIMENTELLES VERFAHREN

1. Verwendete Drosophilastämme und Zuchtbedingungen

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden die 21 erhältlichen Suppressorstämme und als Wildtyp Oregon-R von *Drosophila melanogaster* verwendet. Die einzelnen Genotypen sind nachfolgend aufgezählt und jeweils durch einen Gedankenstrich voneinander getrennt: v f su(f) - su(s)² v ; bw - t ; su(t) - su(Hw)² bx bxd / TM1 - ss bx Su(ss)² - ds^w / In(2L)Cy^{LtR}, Su s, ap^{low} gr - dxst ; Su(dx) - pr ; su(pr)^B / TM6 - Su(er) tu-bw bw ; st er su(tu-bw) - y Su(Cbx) v / FMA³ ; su(Hw) bx bxd / ap^{xa} - Su(H) / In(2L+2R)Cy (alle von der Stammsammlung in Pasadena) - ptg ; px pd ; su(pd) - su(ve) ru ve h th - su(w^a) w^a - Bl bw^D ; Su(283) / T(2;3)ap^{xa} - cm ct⁶ su(Fl^s) / sc^{s1} B In4) sn^{x2} sc⁸ - Su(FM) Cy cn vg Fm (alle von der Stammsammlung in Bowling Green) - su(r) (von Dr.E.Bahn, Kopenhagen) - sc z w^{is} ; Su(z)5 SM5 (von der Stammsammlung in Umea) - y^{50k} w^{bf} S(3)w^{bf}60d5 x y i (von der Stammsammlung in Davis) - C(1)M3 / w^{ch} ; SM1 / Su(w^{ch}) (von der Stammsammlung in La Jolla). Die Zucht dieser Mutanten erfolgte in Flaschen auf Standardfutter (Mais, Hefe, Agar, Zucker) bei 25° C und 50 - 70% Luftfeuchtigkeit. Eine gelegentliche Kontrolle der Genotypen durch Ueberprüfen der Phänotypen oder geeignetes Auskreuzen erwies sich als notwendig. Die Larven oder Fliegen wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Extraktion bei -25° C aufbewahrt.

Für die genetischen Experimente wurden die Mutantenstämme ec ix uni al dp b pr cn va c a px bw mr st / S² Cy pr Bl cn² L⁴ sp² ("twelveple", von der Stammsammlung in Bowling Green), Cy / L ; et und M-2 (Muller-2: In(1)sc^{S11} sc^{8R} + S, sc^{s1} sc⁸ w^a B, von der Stammsammlung in Zürich) verwendet.

2. Genetische Experimente

Für die genetische Lokalisierung des zusätzlichen RNA Flek-
kens in den Suppressorstämmen Su(dx), su(pd), su(ve) und Su(w^{ch})
wurden die Weibchen dieser Mutanten mit Cy / L ; Ki Männchen

und die Söhne der Filialgeneration I sowohl mit Weibchen der jeweiligen Suppressormutanten als auch des Wildtyps gekreuzt. In der Filialgeneration II entstanden daher nebst anderen Phänotypen L Ki Weibchen, Ki und L Männchen, die das erste, zweite oder dritte Chromosom des Suppressorstammes in einer (bei Kreuzung mit dem Wildtyp) oder zwei Dosen (bei Rückkreuzung mit dem Suppressorstamm) trugen. Je 100 - 200 Fliegen dieser Phänotypen wurden ausgelesen und während 14 Stunden mit einem 120 µl Tropfen, Zucker, 2% Essigsäure und 1 mCi [32 P]-Phosphat (NEX-054, NEN England) enthaltend, gefüttert. Die tRNA wurde extrahiert und mit zweidimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese analysiert, wie im folgenden Kapitel beschrieben, unter Auslassung des Deacylierungsschrittes und der Gelfiltration über Sephadex G-100. Vor der Elektrophorese wurde eine zusätzliche Aethanolfällung zur Entsalzung (KAC!) eingeschoben. Die Autoradiographie erfolgte mit Fuji X-Ray Filmen und verstärkenden Wolframfolien bei -90° C während 14 Tagen. Eine Fingerprintanalyse der Su(dx)-spezifischen tRNA^{Arg} erfolgte nach Brownlee (1972).

Für die Feststellung eines Suppressionseffektes der vier genannten Suppressorstämme auf die Expression von dx wurden ec dx Weibchen mit Männchen je eines Suppressorstammes gekreuzt. In der Filialgeneration I konnten die Männchen auf die Expression von dx geprüft werden, da sie für dx hemizygot waren. Die Kriterien bezüglich dx sind in den Resultaten erwähnt.

Für die genauere Lokalisierung von Su(dx) auf dem zweiten Chromosom mussten in einem ersten Schritt das Balancerchromosom "Muller-5" und die Mutation dx in den genetischen Markerstamm "twelveple" eingekreuzt werden, damit nachher bei der Auskreuzung mit Su(dx) die Mutation dx balanciert und daher homozygot in die Filialgeneration II weitergegeben werden konnte. Die notwendigen 6 Kreuzungen und die daraus resultierenden interessierenden Nachkommen sind der Uebersicht halber im folgenden Schema aufgezeichnet (M-5 = Muller-5 Balancerchromosom; tw = "twelveple" Markerchromosom, Cy = Balancerchromosom des "twelveple" Stammes):

$$(1) \quad \underline{M-5} / X \quad x \quad X / Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$(2) \quad \underline{M-5} / X ; \underline{Cy} / + \quad x \quad X / Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$\underline{M-5} / X ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$(3) \quad \underline{ec} \underline{dx} / \underline{ec} \underline{dx} \quad x \quad X / Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$(4) \quad \underline{ec} \underline{dx} / X ; \underline{Cy} / + \quad x \quad X / Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$(\underline{ec}) \underline{dx} \quad Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

$$(5) \quad \underline{M-5} / X ; \underline{tw} / \underline{Cy} \quad x \quad \underline{dx}^{st} / Y ; \underline{Su(dx)}$$

$$(6) \quad \text{Einzelkreuzungen:}$$

$$\underline{M-5} / \underline{dx}^{st} ; \underline{Su(dx)} / \underline{tw} \quad x \quad (\underline{ec}) \underline{dx} / Y ; \underline{tw} / \underline{Cy}$$

Unter den Nachkommen der sechsten Kreuzung wurden die non-Bar und die non-Curly Fliegen phänotypisch analysiert; darunter befanden sich die gewünschten Rekombinanten. Auf die Schwierigkeiten der Phänotypüberlagerungen und der Subvitalität einzelner Markermutanten wurde bei den Resultaten hingewiesen. Sämtliche Kreuzungen mussten bei 25° C durchgeführt werden, damit die Expression der Markermutationen gewährleistet blieb.

3. Extraktion von tRNA und ribosomalen Proteinen. Zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die tRNA Isolation erfolgte in drei Schritten: Phenol-extraktion (Kirby, 1956), Kaliumacetatfällung (Kern, 1975) und Gelfiltration über Sephadex G-100 (Hosbach, 1977). Anschliessend wurde die tRNA bei 37° C und pH 9 während einer Stunde deacyliert. Die Isolation der ribosomalen Proteine wurde nach Lambertsson(1974) ausgeführt. Die Analyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese folgte für tRNA der Methode von Fradin et al.(1975), ausführlich beschrieben bei Egg

(1978), für ribosomale Proteine derjenigen von Kaltschmidt und Wittmann (1970), modifiziert von Coddington und Flury (1977). Für eine Gelanalyse wurde 1.5 OD₂₆₀ tRNA (1 mm Gel) oder 3 mg ribosomale Proteine (3 mm Gel) verwendet. Die Färbung von tRNA erfolgte mit Stainsall (0.005% in 50% Formamid), von ribosomalen Proteinen mit Amidoschwarz.

4. Vorfraktionierungen und Reinigung von Drosophila und Hefe tRNA. Präparation von mRNA

Drosophila tRNA (je 100 - 200 OD₂₆₀) aus Suppressorstämmen wurde mit Reversed-Phase Chromatographie (RPC-5; Pearson et al., 1971; ausführlich beschrieben bei Hosbach, 1977; Salzgradient 0.55 - 0.9 M NaCl, 2 x 100 ml) oder mit benzoylierter DEAE-Cellulose (BDC; Salzgradient 0.35 - 1.2 M NaCl, 2 x 100 ml; Aethanol-schritt 20% Aethanol) aufgetrennt. Die Dimension der BDC-Säule betrug 0.8 x 50 cm, die Flussrate 60 ml/h; das Säulenmaterial wurde von Boehringer, Mannheim, geliefert. Die Anreicherungs-faktoren sind in den Resultaten genannt. Für die Oocyteninjektion mussten die Proben möglichst salzfrei sein, weshalb die tRNA Fraktionen nach der Chromatographie 2 - 3 mal mit Aethanol gefällt wurden (dazwischen in 0.1 M NaAcetat gelöst).

Niedermolekulare RNA von *S.cerevisiae* wurde durch SDS-Lyse der Zellen (erhalten von Dr.J.D.Smith, Cambridge, UK) von SUP5-a (Stamm L-133) und SUP5-o (Stamm SL171-2C) und Phenolextraktion erhalten (Rubin, 1974). Als weiterer Reinigungsschritt wurde eine Kaliumacetatfällung angeschlossen (Kern, 1975). Tyrosin tRNA wurde mittels eindimensionaler Polyacrylamid Gelelektrophorese (Egg, 1978; 10% Gel), Aethidumbromidfärbung (10 µg/ml) und nachfolgender Elution (Maxam und Gilbert, 1977) 5 - 8-fach angereichert, wobei der Reinigungsfaktor mittels Aminoacylierung (Kohli et al., 1979) bestimmt wurde. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen von *S.pombe* wurden von J.Kohli, Univ.Bern, erhalten. Die amber, bzw. ochre Suppressor tRNA^{Tyr} entspricht jeweils einem Achtel der gesamten Tyrosin tRNA (*S.cerevisiae* besitzt 8 Gene für Tyrosin tRNA, Hawthorne und Leupold, 1974), d.h. 3 - 5% der verwendeten partiell gereinigten

Tyrosin tRNA Fraktion. Die Mengenangaben bei den Resultaten beziehen sich immer auf die eigentliche Suppressor tRNA, d.h. sowohl der Reinigungsfaktor wie auch der Verdünnungseffekt durch Wildtyp tRNA sind miteinberechnet.

Opal Suppressor tRNA^{Ser} vom *S.pombe* Stamm sup3-e und Gesamt-tRNA vom Stamm sup3-i (ochre Suppressor) wurden von Dr.J.Kohli, Univ.Bern, zur Verfügung gestellt. Die opal Suppressor tRNA konnte während der Reinigung von der Serin Hauptakzeptoraktivität abgetrennt werden, der Reinheitsgrad betrug 80% (Kohli et al., 1979). Serin tRNA des Stammes sup3-i wurde gelelektrophoretisch wie oben beschrieben 10-fach angereichert (die gesamte Serin Akzeptoraktivität ist in derselben Gelbande enthalten), so dass die Suppressor tRNA^{Ser} 25% der verwendeten Probe betrug.

Tyrosin tRNA von *S.pombe* (70% rein) wurde von Dr.J.Kohli, Univ.Bern, reine Tryptophan tRNA von *S.cerevisiae* von Dr.G.Keith, Strassburg, reine Phenylalanin tRNA von *S.cerevisiae* von Boehringer, Mannheim, erhalten.

Die beiden Tyrosin tRNA Isoakzeptoren von *Drosophila* wurden mit Chromatographie über Sepharose 4B (Holmes et al., 1975; Salzgradient 1.3 - 0 M Ammoniumsulfat, ausführlich beschrieben bei Egg, 1978) und RPC-5 (Salzgradient 0.5 - 0.7 M NaCl) angereichert. In einem dritten Schritt wurde tRNA^{Tyr}_G mit einem 10% Gel (Egg, 1978), tRNA^{Tyr}_Q mit einem 20% Gel (Egg, 1978) von den restlichen kontaminierenden tRNAs abgetrennt (siehe auch Resultate). Nach jedem Schritt des Reinigungsverfahrens wurde stets das Tyrosin Akzeptorprofil mittels Aminoacylierung von Fraktionsaliquoten (je ca. 0.1 OD₂₆₀) bestimmt, damit die Anreicherung möglichst optimal erreicht und eine gegenseitige Kontamination der Isoakzeptoren vermieden werden konnte. Mit Ausnahme der Sepharose 4B Chromatographie, die weggelassen wurde, wurde für die Reinigung der beiden Tyrosin tRNA Isoakzeptoren von su(s)² das gleiche Verfahren angewendet. Der Reinheitsgrad von tRNA^{Tyr}_Q betrug mindestens 70%. Reine su(s)² tRNA^{Tyr}_G wurde von B.Suter, Univ.Zürich, erhalten. Der Nebenisoakzeptor tRNA^{Tyr}_m wurde mit einem 20% Gel der RPC-5 Fraktionen E und F zu einer Reinheit von mindestens 50% erhalten.

Tryptophan tRNA von *Drosophila* wurde aus zweidimensionalen Gelen (Egg, 1978) von RPC-5 Fraktionen eluiert (mindestens 50% rein). Die Reinigung der übrigen verwendeten tRNA ($\text{tRNA}_{4}^{\text{Glu}}$, $\text{tRNA}_{6}^{\text{Asp}}$, tRNA^{Asn} , $\text{tRNA}_{2}^{\text{Arg}}$, $\text{tRNA}_{2}^{\text{Phe}}$, $\text{tRNA}_{4}^{\text{Val}}$, $\text{tRNA}_{8}^{\text{His}}$) ist anderswo beschrieben (Schmidt, 1980; Dudler, 1981). Reine Su(dx)-spezifische tRNA^{Arg} wurde von E.Züblin, Univ.Zürich, erhalten.

Tabak Mosaik Virus wurde von Dr.P.J.G.Butler, Cambridge,UK, erhalten und die RNA nach Marcus et al. (1974) extrahiert. Die Probe wurde durch dreimaliges Fällern mit Aethanol entsalzt (Lösung dazwischen jeweils in 0.1 M NaAcetat). Eine fünfminütige Inkubation bei 37° C vermochte das vorher sichtbare Aggregat zu lösen. Globin mRNA vom Kaninchen wurde von Dr.J.Kohli, Univ.Bern, von *Xenopus laevis* von Dr.H.Hosbach, Univ.Bern, zur Verfügung gestellt.

5. Suppressionsteste

Die Beladung entleerter roter Blutzellen mit tRNA und ihre Fusion mit den Testzellen (Maus Myeloma Zelllinie MOPC 21, Mutanten IF3 und X63) ist anderswo (Kaltoft und Celis, 1978) detailliert beschrieben worden; die einzige Modifikation bestand darin, dass die menschlichen Blutzellen mit 2 mM ATP (pH 7) lysiert wurden. Für die Fusion wurde als weitaus effizientestes und schonendstes Agens Polyäthylenglycoll (PEG) 6000 von Koch-Light verwendet. Jeweils 0.25 - 3 mg vorfraktionierte *Drosophila* tRNA oder 50, bzw. 100 ng ochre Suppressor tRNA^{Ser} , bzw. tRNA^{Tyr} (Menge bezogen auf reine Suppressor tRNA) wurden für die Beladung von 10^7 Ghosts verwendet, worauf diese mit 10^6 Myelomazellen fusioniert wurden. Die Inkubation der Zellen erfolgte in 200 μl complete Dulbecco's Medium, supplementiert mit 10% Kalbsserum, mit 20 μCi [^{35}S]-Methionin (Amersham, England) während 20 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (2 min., 600 g) und sowohl der Ueberstand wie auch das Pellet mit SDS-Probenpuffer versetzt (30 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 2.5% β -Mercaptoäthanol, 5% Glycerin, doppelt konzentriert verwendet, falls eine Verdünnung von 1 : 1 erfordert wurde) und 3 min. gekocht. Für die Analyse der Proteine mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970;

12% Acrylamid, 0.06% Bisacrylamid) wurden für das Pellet 200'000 cpm, für den Ueberstand 50'000 cpm verwendet. Die Gele wurden in 7% Essigsäure fixiert, anschliessend getrocknet und 2 - 4 Tage mit Fuji X-Ray Filmen exponiert.

Drosophila melanogaster Embryonalkulturen wurden nach Dübendorfer und Eichenberger-Glinz (1980) hergestellt.

Die Injektion der *Drosophila* Weibchen erfolgte nach der Transplantiermethode (Schubiger, 1968). Trypanblau (Merck) wurde zu 0.1 und 0.01% in doppeltdestilliertem Wasser gelöst und über Nacht dagegen dialysiert. Die Sichtbarkeitsgrenze konnte durch Verdünnung dieser Lösungen festgestellt werden. Fluoreszierendes Immunglobulin (FITC-Ig) wurde von Dr. J.C. Perriard, ETH-Zürich, zur Verfügung gestellt. Haemoglobin wurde durch Lyse menschlicher Blutzellen in Wasser erhalten. Für eine Analyse wurden jeweils 5 Weibchenabdomina mit je 200 nl Lösung injiziert. Die Konzentrationen und Inkubationsbedingungen sind in den Resultaten angegeben. Homogenisation der seziierten Oocyten, Ovary oder Restabdomina erfolgte in 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12 mM EDTA in einem Teflonhomogenisator (20 µl), und der Ueberstand wurde nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 600 g mit Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 80 mM Tris-HCl, pH 6.8, 8 mM EDTA, 1% SDS, 10% β -Mercaptoäthanol, 5% Glycerin und etwas Bromphenolblau) und während 5 min. gekocht. Die eindimensionale Gelanalyse (15% Acrylamid, 0.2% Bisacrylamid) erfolgte nach Laemmli (1970). Anschliessend wurden die Gele in 7% Essigsäure fixiert, mit PPO imprägniert (Bonner und Laskey, 1974), getrocknet und während 3 - 8 Tagen bei -90° C exponiert.

Das proteinsynthetisierende "in vitro" System von *Drosophila* wurde nach Scott et al. (1979) durchgeführt. Es wurden 12 - 19-stündige Embryonen (Volumen 0.5 - 1 ml) in gleichem Volumen 10 mM Hepes, pH 7.6, 6 mM β -Mercaptoäthanol homogenisiert und durch Zentrifugation (20 min.) ein S40 Ueberstand erhalten. Hundert µl davon wurden mit 20 µg Kreatinkinase versetzt. Für einen Ansatz wurde 10 µl Lysat, 0.1 - 10 µg mRNA, 70 µCi [³⁵S]-Methionin (Amersham, England) und übrige Reagenzien, wie bei Scott et al. (1979) beschrieben, verwendet.

Xenopus laevis Oocyten wurden durch Operation eine Frosches gewonnen und anschliessend mit einer Platindrahtöse vom Ovar gepupft. Injektion von 1 μ l in H₂O gelöster RNA (möglichst salzfrei, Konzentrationsangaben bei den Resultaten) in zwanzig grosse Oocyten erfolgte in Barth's Medium (Gurdon, 1968) bei 18° C, wobei die Oocyten auf ein nasses Filterpapier gelegt wurden. Die tRNA Proben wurden jeweils vor der Injektion während 5 min. bei 37° C renaturiert. Pro Test wurden mindestens 7 Oocyten in 10 μ l/Oocyte Barth's Medium und 30 - 70 μ Ci [³⁵S]-Methionin (700 - 1000 Ci/mMol, Amersham, England) oder 10 - 20 μ Ci [³H]-Histidin (42 Ci/mMol, Amersham, England) für 18 - 24 Stunden bei 18° C inkubiert. Die Histidinmarkierung wurde nur bei Injektion von Globin mRNA verwendet, weil Globine verhältnismässig viel Histidin enthalten im Gegensatz zu den kleinen Proteinen der *Xenopus* Oocyte und daher Globine selektiv im Vergleich zu Background markiert werden können. Nach der Inkubation wurden die Oocyten zweimal mit Wasser gespült und bei -25° C eingefroren. Die Extraktion der löslichen Proteine erfolgte wie oben für *Drosophila* Oocyten beschrieben; die Proben wurden jedoch nicht gekocht. Die Analyse der synthetisierten Proteine mit eindimensionalen Gelen (Laemmli, 1970) wurde ebenfalls bereits beschrieben für die *Drosophila* Oocytenproteine; nach Globin mRNA Injektion wurden 15% Gele (0.2% Bisacrylamid), nach TMV RNA Injektion 7.5% (0.1% Bisacrylamid) verwendet. Die Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974) war nur für [³H]-Markierungen erforderlich. Für die Trennung von α - und β -Globin wurden eindimensionale saure Harnstoffgele (15% Acrylamid, 0.1% Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, 0.6% Triton X-100, übrige Angaben bei Rovera et al., 1978) verwendet. Die Proteinfärbung gleichzeitig aufgetrennten Kaninchen Hämoglobins als Marker erfolgte mit 0.25% Coomassie Brilliant Blue in 40% Methanol, 7% Essigsäure. Nach der Entfärbung mit derselben Lösung ohne Farbstoff konnte bei [³H]-markierten Proben ein Imprägnationsschritt in Enhancer (NEN, England) während einer Stunde angefügt werden, ohne dass der Farbstoff ganz aus dem Gel herausgelöst wurde. Für diese Analyse, wie für die zweidimensionale Gelelektrophorese nach O'Farrell (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977), wurden die Rohextrakte der Oocyten nicht

mit SDS-Probenpuffer, sondern mit dem entsprechenden Harnstoffprobenpuffer versetzt.

Für das "in vitro" Kaninchen Retikulozytensystem (Pelham, 1978) wurden die Vorschriften von NEN (England) unter der Verwendung der von NEN gelieferten Reagenzien befolgt. Die elektrophoretische Analyse der Proteine wurde im vorangehenden Abschnitt beschrieben.

ZUSAMMENFASSUNG

Suppression wurde als Modellsystem für das Studium von Gen-Phän Reaktionsketten gewählt. Das Ziel der Arbeit bestand darin, potentielle Nonsensesuppressoren bei *Drosophila* Suppressionsmutanten zu entdecken. Als Methode dazu wurde einerseits hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese zur Aufdeckung von Musterabnormitäten bei tRNA und ribosomalen Proteinen angewendet, andererseits ein sensitives "in vivo" Testsystem, basierend auf der *Xenopus* Oocyte, entwickelt.

Das Screening nach Musterabnormitäten bei ribosomalen Proteinen von *Drosophila* Suppressorstämmen fiel negativ aus, während sich bei der analogen Analyse der tRNA eine Mutanten-spezifische tRNA^{Arg} bei Su(dx), su(ve), su(pd) und Su(w^{ch}) identifizieren liess. Die genetische Analyse ergab, dass die Ursache dieser tRNA^{Arg} auf dem 2.Chromosom lokalisiert ist, in ihrer Wirkung dominant ist und einen Dosiseffekt zeigt. Diese drei Kriterien gelten auch für die Mutation Su(dx). Deltex wird nicht nur von Su(dx), sondern auch von su(ve) und su(pd) supprimiert. Ausgehend von diesen Resultaten wurde die Hypothese formuliert, dass der Suppressionsmechanismus von Su(dx) in einem Zusammenhang mit der Mutanten-spezifischen tRNA^{Arg} steht.

Es gelang, ein sensitives "in vivo" Testsystem für Nonsense-suppression zu entwickeln, welches die Entdeckung geringer Suppressoraktivitäten, welche bei der Mutation eines einzelnen *Drosophila* tRNA Gens entstehen, ermöglicht. Das System beruht auf der Synthese von Readthrough Proteinen nach der Injektion von Kaninchen Globin mRNA (Stopcodon UGA), bzw. Tabak Mosaik Virus RNA (Stopcodon UAG?) und opal, bzw. amber und ochre Suppressor tRNAs von Hefe. Unter den 230 getesteten *Drosophila* tRNA Fraktionen von 21 Suppressormutanten zeigte sich keine opal Suppressoraktivität.

Es stellte sich heraus, dass nicht nur Hefe amber und ochre Suppressor tRNAs im TMV Test Readthrough Aktivität zeigten, sondern auch Wildtyp Tyrosin tRNA. Je eine tRNA Fraktion pro geteste-

ten Genotypen erwies sich als aktiv bezüglich TMV Readthrough. Dieser Befund dient zwar dem Beweis der Funktionalität von Drosophila tRNA im Xenopus Oocyten Suppressionstest, schränkt aber die Aussage über das Vorhandensein von amber und ochre Suppressor tRNAs ein.

Obwohl das Stopcodon des TMV 110k Proteins nicht sequenziert ist, muss das Resultat der Wildtyp Tyrosin tRNA daraufhin interpretiert werden, dass Tyrosin tRNA eine inhärente Fähigkeit zu einem "two out of three Misreading" besitzt, möglicherweise auf der modifizierten Base (ψ) in der mittleren Anticodonposition beruhend. Dieses Misreading kann nicht als Artefakt bezeichnet werden, da es in allen Systemen, insbesondere auch in TMV-infizierten Pflanzenzellen, beobachtet wurde und da sich das Xenopus Oocyten System als immun gegenüber Artefakten erwiesen hat. Bemerkenswert ist ausserdem das Resultat, dass der Q*-modifizierte Tyrosin tRNA Isoakzeptor von Drosophila keine Readthrough Aktivität bezüglich TMV zeigt. Die Q*-Basenmodifikation an der ersten Anticodonposition schränkt die Decodierungsfähigkeit dieses Isoakzeptors auf die "kognaten" Tyrosin Codonen ein und verhindert das "two out of three Misreading".

Bei su(s)^2 zeigte der Q*-modifizierte Tyrosin tRNA Isoakzeptor Readthrough Aktivität im TMV Suppressionstest. Es wird vermutet, dass su(s)^2 entweder eine mutante amber oder ochre Suppressor tRNA^{Tyr} enthält oder dass eine Veränderung in der Basenmodifikation von su(s)^2 tRNA^{Tyr} die Readthrough-inhibierende Wirkung von Q* kompensiert.

Durch Injektion von Hefe Suppressor tRNAs in Xenopus Oocyten wurde festgestellt, dass alle drei Terminationscodonen (UAG, UAA und UGA) in vergleichbarem Ausmass auf den aktiv translatierten mRNAs der Oocyte enthalten sind, denn alle drei Typen von Suppressor tRNAs vermochten Veränderungen im Muster der synthetisierten Oocytenproteine zu induzieren. Der Prozentsatz der veränderten Proteine war allerdings gering, woraus geschlossen wurde, dass eukaryontische Stopcodonen gegen Readthrough geschützt sind. Diese Vermutung wird durch den Vergleich von Sequenzkontexten von Stopcodonen eukaryontischer mRNAs unterstützt.

ABKUERZUNGEN

tRNA	transfer Ribonukleinsäure
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
AsN	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Arg	Arginin
Glu	Glutaminsäure
His	Histidin
Phe	Phenylalanin
Ser	Serin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
HGPRT	Hypoxanthin-Guanosin-Phosphoribosyl-Transferase
RNase	Ribonuklease
PPO	2,5 - Diphenyloxazol
DEAE	Diäthylaminoäthan
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Hepes	N-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure
k	kilo (1000 Dalton)
kb	Kilobasen (1000 Basen)
MG	Molekulargewicht
OD ₂₆₀	Absorption bei 260 nm (1 OD ₂₆₀ $\hat{=}$ 50 μ g RNA)
TMV	Tabak Mosaik Virus
am	amber (UAG)
oc	ochre (UAA)
op	opal (UGA)
wt	Wildtyp

LITERATURVERZEICHNIS

- Altman, S. (1978). Biosynthesis of tRNA. In: "Transfer RNA". S.Altman, ed.. pp. 48 - 77. MIT Press, Cambridge.
- Altwegg, M., and Kubli, E. (1979). The nucleotide sequence of phenylalanine tRNA₂ of *Drosophila melanogaster*: four iso-acceptors with one² basic sequence. Nucl.Acids Res. 7,93-105.
- Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Reid, B.R., and Anderson, C.W. (1979). Normal tRNAs promote ribosomal frameshifting. Cell 18,1119-1131.
- Barrell, B.G., Bankier, A.T., and Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. Nature 282,189-194.
- Benzer, S., and Champe, S.P. (1962). A change from nonsense to sense in the genetic code. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 48,1114-1121.
- Bergquist, P.L., Burns, D.J.W., and Plinston, C.A. (1968). Participation of redundant transfer ribonucleic acids from yeast in protein synthesis. Biochem. 7,1751-1760.
- Bienz, M., Kubli, E., Kohli, J., deHenau, S., Huez, G., Marbaix, G., and Grosjean, H. (1981). Usage of the three termination codons in a eukaryotic cell: the *Xenopus laevis* oocyte. Appendix: Compilation and analysis of the known prokaryotic and eukaryotic translation termination sequences. Mol.gen.Genet., submitted.
- Bonner, W.M., and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Europ.J.Biochem. 46,83-88.
- Bonnier, G. (1927). Note on the so-called vermilion-duplication. Hereditas 7,229-232.
- Bossi, J.R., and Roth, J.R. (1980). The influence of codon context on genetic code translation. Nature 286,123-127.
- Brenner, S., and Beckwith, J.R. (1965). Ochre mutants, a new class of suppressible nonsense mutants. J.Mol.Biol. 13,629-637.
- Bridges, C. (1919). Duplications. Anat.Record 15,357-358.
- Brownlee, G.G. (1972). Determination of sequences in RNA. North-Holland/American Elsevier, Amsterdam/New York.
- Bruening, G., Beachy, R.N., Scalla, R., and Zaitlin, M. (1976). "In vitro" and "in vivo" translation of the ribonucleic acids of a cowpea strain of tobacco mosaic virus. Virology 71,498-517.
- Capecchi, M., and Gussin, G. (1965). Suppression in vitro: Identification of a serine-sRNA as a "nonsense" suppressor. Science 149,417-422.

- Capecchi, M., Hughes, S.H., and Wahl, G.M. (1975). Yeast suppressors are altered tRNAs capable of translating a nonsense codon "in vitro". *Cell* 6,269-277.
- Capecchi, M., Van der Haar, R.A., Capecchi, N.E., and Sueda, M.M. (1977). The isolation of a suppressible nonsense mutant in mammalian cells. *Cell* 12,371-381.
- Caskey, C.T., Fenwick, R.G., Kruh, G., and Konecki, D. (1979). Characterization of premature chain termination mutants of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and their revertants in chinese hamster cells. In: Nonsense mutations and tRNA suppressors. J.E.Celis and J.D.Smith, eds. pp.235-253. Academic Press, London.
- Celis, J.E., and Smith, J.D. (1979) Nonsense mutations and tRNA suppressors. Academic Press, London.
- Celis, J.E., Kaltoft, K., Celis, A., Fenwick, R., and Caskey, C.T. (1979). Microinjection of tRNAs into somatic cells. In: Nonsense mutations and tRNA suppressors. J.E.Celis and J.D. Smith, eds. pp.255-276. Academic Press, London.
- Coddington, A., and Flury, R. (1977). Characterization of the ribosomal proteins from *Schizosaccharomyces pombe* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol.gen.Genet.* 158,93-100.
- Colby, D.S., Schedl, P., and Guthrie, C. (1976). A functional requirement for modification of the wobble nucleotide in the anticodon of a T2 suppressor tRNA. *Cell* 9,449-463.
- Cremer, K.J., Bodemer, M., Summers, W.P., Summers, W.C., and Gesteland, R.F. (1979). In vitro suppression of UAG and UGA mutants in the thymidine kinase gene of herpes simplex virus. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 76,430-434.
- Crick, F.H.C. (1966). Codon-anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J.Mol.Biol.* 19,548-555.
- DeRonde, A., VanLoon, A.P.G.M., Grivell, L.A., and Kohli, J. (1980). "In vitro" suppression of UGA codons in a mitochondrial mRNA. *Nature* 287,361-363.
- Dudick, M.E., Wright, T.R.F., and Brothers, U. (1973). The developmental genetics of the temperature-sensitive lethal allele of the suppressor of forked, 1(l)su(f)ts^{67g} in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 76,487-510.
- Dudler, R. (1981). Charakterisierung von tRNA Genen bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich.
- Dübendorfer, A. and Eichenberger-Glinz, S. (1980). Development and metamorphosis of larval and adult tissues of *Drosophila* in vitro. In: Invertebrate systems in vitro. E.Kurstak, K.Maramorosch, and A.Dübendorfer, eds. pp.169-185. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

- Egg, A.H. (1978). Eine vergleichende Analyse der tRNA und 5S rRNA bei der Letalmutante l(3)tr und dem Wildtyp von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich.
- Engelberg-Kulka, H., Dekel, L., Israeli-Roches, M., and Belfort, M. (1979). The requirement of nonsense suppression for the development of several phages. *Mol.gen.Genet.* 170,155-159.
- Feinstein, S.I., and Altman, S. (1978). Context effects on nonsense codon suppression in *Escherichia coli*. *Genetics* 88,201-219.
- Finnerty, V.G., Barton, L.M., and Schalet, A. (1973). The suppressor-of-forked mutation: a putative protein synthesis mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 74,s79.
- Fradin, A., Gruhl, H., and Feldmann, H. (1975). Mapping of yeast tRNAs by twodimensional electrophoresis on polyacrylamide gels. *FEBS Letters* 50,185-189.
- Gatica, M., Tarrago, A., Allende, C.C. and Allende, J.E. (1975). Aminoacylation of transfer RNA microinjected into *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 256,675-677.
- Gefter, M.L., and Russel, R.L. (1969). Role of modifications in tyrosine transfer RNA: A modified base affecting ribosome binding. *J.Mol.Biol.* 39,145-157.
- Geller, A.I., and Rich, A. (1980). A UGA termination suppression tRNA^{Trp} acting in rabbit reticulocytes. *Nature* 283,41-46.
- Gesteland, R.F., Wolfner, M., Grisafi, P., Fink, G., Botstein, D., and Roth, J.R. (1976). Yeast suppressors of UAA and UAG nonsense codons work efficiently "in vitro" via tRNA. *Cell* 7, 381-390.
- Gesteland, R.F., Wills, N., Lewis, J.B., and Grodzicker, T. (1978). Identification of amber and ochre mutants of the human virus Ad2^{ND1}. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74,4567-4571.
- Giglion, B., Gianni, A.M., Comi, P., Ottolenghi, S., and Rungger, D. (1973). Translational control of globin synthesis by haemin in *Xenopus* oocytes. *Nature* NB 246,99-102.
- Ginzburg, I., Cornelis, P., Givon, D., and Littauer, U.Z. (1979). Functionally impaired tRNA from ethionine treated rats as detected in injected *Xenopus* oocytes. *Nucl.Acids Res.* 6,657-672.
- Goodman, H.M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S., and Smith, J.D. (1968). Amber suppression: a nucleotide change in the anti-codon of a tyrosine transfer RNA. *Nature* 217,1019-1024.
- Goodman, H.M., Olson, M.V., and Hall, B.D. (1977). Nucleotide sequence of a mutant eucaryotic gene: The yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP4-o. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74,5453-5457.

- Gorini, L. (1970). Informational suppression. *Ann.Rev.Genet.* 4, 107-134.
- Grigliatti, T.A., White, B.N., Tener, G.M., Kaufman, T.C., Hol-
den, J.J., and Suzuki, D.T. (1973). Studies on transfer RNA
genes of *Drosophila*. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.
38,461-474.
- Green, M.M. (1952). Pseude-allelism at the vermilion locus in
Drosophila melanogaster. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 40,92-99.
- Grosjean, H., deHenau, S., and Crothers, D.M. (1978). On the
physical basis for ambiguity in genetic coding interactions.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75,610-614.
- Grosjean, H., and Chantrenne, H. (1981). On codon-anticodon inter-
actions. In: *Biological Recognition*. F.Chapeville and A.L.
Haenni, eds. Springer, in press.
- Gurdon, J.B. (1968) Changes in somatic nuclei inserted into growing
and maturing amphibian oocytes. *J.Embryol.exp.Morph.* 20,401-
414.
- Gurdon, J.B. (1974). The control of gene expression in animal
development. Harvard Univ.Press, Cambridge, Mass.
- Hankins, W.D., and Farkas, W.R. (1970). Guanylation of transfer
RNA by rabbit reticulocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 213,77-89.
- Hawthorne, D.C., Leupold, U. (1974). Suppressors in yeast. *Curr.*
Top.Microbiol.Immunol. 64,1-47.
- Heckman, J.E. (1975) Structure-function relationship studies
on eukaryotic suppressor and initiator transfer ribonucleic
acids and transfer ribonucleic acids containing unusual
modified bases. Dissertation, MIT, Cambridge, Mass.
- Hirsh, D. (1971). Tryptophan transfer RNA as the UGA suppressor.
J.Mol.Biol. 58,439-458.
- Holmes, W.M., Hurd, R.E., Reid, B.R., Rimmerman, R.A., and Hat-
field, G.W. (1975). Separation of transfer ribonucleic acid
by sepharose chromatography using reverse salt gradients.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72,1068-1071.
- Hosbach, H. (1977). Vergleich der Aminoacylierung und der Iso-
akzeptorenmuster der tRNA junger und alter Fliegen von
Drosophila melanogaster. Dissertation, Universität Zürich.
- Hosbach, H.A., and Kubli, E. (1979). Transfer RNA in aging *Droso-*
phila: II. Isoacceptor patterns. *Mech.Age.and Develop.* 10,
141-149.
- Hunter, A.R., Hunt, T., Knowland, J., and Zimmern, D. (1976).
Messenger RNA for the coat protein of tobacco mosaic virus.
Nature 260,759-764.
- Jacobson, K.B. (1971). Role of an isoacceptor transfer ribonucleic
acid as an enzyme inhibitor: effect on tryptophan pyrrolase
of *Drosophila*. *Nature NB* 231,17-19.

- Jacobson, K.B., Calvino, J.F., Murphy, J.B., and Warner, C.K. (1975). Mechanism of suppression in *Drosophila*: II. Enzymatic discrimination of wild-type and suppressor tyrosine transfer RNA. *J.Mol.Biol.* 93,89-97.
- Jacobson, K.B. (1978). Mechanisms of suppression in *Drosophila*: VII. Correlation between disappearance of an isoacceptor of tyrosine tRNA and activation of the vermilion locus. *Nucl.Acids Res.* 6,2391-2404.
- Kaltoft, K., and Celis, J.E. (1978). Ghost-mediated transfer of human hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase into deficient chinese hamster ovary cells by means of polyethylene glycol-induced fusion. *Exp.Cell Res.* 115,423-428.
- Kaltschmidt, E., and Wittmann, H.G. (1970). Ribosomal proteins. VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins. *Anal.Biochem.* 36,401-412.
- Kasai, H., Kuchino, Y., Nihei, K., and Nishimura, S. (1975). Distribution of the modified nucleoside Q and its derivatives in animal and plant transfer RNAs. *Nucl.Acids Res.* 2,1931-1939.
- Katze, J.R. (1975). Alterations in SVT2 cell transfer RNAs in response to cell density and serum type. *Biochim.Biophys. Acta* 383,131-139.
- Kern, H. (1975). Fractionation of nucleic acids with special regard to rapidly labeled RNA. *Anal.Biochem.* 67,147-156.
- King, R.C. (1970). Ovarian development of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Kirby, J.D. (1956). A new method for the isolation of ribonucleic acids for mammalian tissues. *Biochem.J.* 64,405-408.
- Knowland, J. (1974). Protein synthesis directed by the RNA from a plant virus in a normal animal cell. *Genetics* 78,383-394.
- Kohli, J., Kwong, T.C., Altruda, F., Söll, D., and Wahl, G. (1979). Characterization of a UGA-suppressing serine tRNA from *Schizosaccharomyces pombe* with the help of a new "in vitro" system for eukaryotic suppressor tRNAs. *J.Biol.Chem.* 254,1546-1551.
- Körner, A., Feinstein, S.I., and Altman, S. (1978). Transfer RNA-mediated suppression. In: *Transfer RNA*. S.Altman, ed. pp. 105-135. MIT, Cambridge, Mass.
- Kubli, E. (1980). Localization of tRNA genes on *Drosophila melanogaster* polytene salivary gland chromosome. In: *Transfer RNA: Biological Aspects*. D.Söll, J.N.Abelson, and P.R.Schimmel, eds. pp.559-561. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kurland, C.G. (1979). Reading frame errors on ribosomes. In: *Nonsense mutations and tRNA suppressors*. J.E.Celis and J.D. Smith, eds. pp.97-108. Academic Press, London.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 681-685.
- Lagerkvist, U. (1978). Two out of three : An alternative method for codon reading. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75,1759-1762.
- Lambertsson, A.G. (1974). The ribosomal proteins of *Drosophila melanogaster*. III. Further studies on the ribosomal protein composition during development. *Mol.gen.Genet.* 128,241-247.
- Lambertsson, A.G. (1975). The ribosomal proteins of *Drosophila melanogaster*. IV. Characterization by two-dimensional gel electrophoresis of the ribosomal proteins from nine post-embryonic stages. *Mol.gen.Genet.* 139,133-144.
- Lambertsson, A.G. (1975) The ribosomal proteins of *Drosophila melanogaster*. V. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis of the ribosomal proteins of the temperature-sensitive lethal allele of suppressor of forked 1(l)su(f)ts^{67g}: a putative ribosomal protein mutant. *Mol.gen.Genet.* 139, 145-156.
- Li, M., and Tzagoloff, A. (1979). Assembly of the mitochondrial membrane system: sequences of yeast mitochondrial valine and an unusual threonine tRNA. *Cell* 18,47-53.
- Lindsley, D.L., and Grell, E.H. (1967) Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst.Wash.Publ. No. 627.
- Macino, G., Coruzzi, G., Nobrega, F.G., Li, M., and Tzagoloff, A. (1979). Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 76,3784-3785.
- Manley, J.L. (1978). Synthesis and degradation of termination and premature-termination fragments of β -galactosidase in vitro and in vivo. *J.Mol.Biol.* 125,407-432.
- Marcus, A., Seal, S., and Weeks, D.P. (1974). Protein chain initiation in wheat embryo. In: *Methods in enzymology*, K.Moldave and L.Grossman, eds. pp.94-101. Academic Press, New York.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 74,560-564.
- McKinnon, R.D., Wosnick, M.A., and White, B.N. (1978). The role of guanine insertion enzyme in Q-biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Nucl.Acids Res.* 5,4865-4876.
- Mischke, D., Kloetzel, P., and Schwochau, M. (1975). Tryptophan pyrolyase activity regulation in *Drosophila*: role of an iso-acceptor tRNA unsettled. *Nature* 255,79-80.
- Mitra, S.K., Lustig, P., Akesson, B., Lagerkvist, U., and Strid, L. (1977). Codon-anticodon recognition in the valine codon family. *J.Biol.Chem.* 252,471-478.

- Morch, M.D., and Benicourt, C. (1980). Polyamines stimulate suppression of amber termination codons in vitro by normal tRNAs. *Europ.J.Biochem.* 105,445-451.
- Nishimura, S. (1979). Modified nucleosides in tRNA. In: *Transfer RNA: Structure, Properties, and recognition*. P.R.Schimmel, D.Söll, and J.N.Abelson, eds. pp.59-79. Cold Spring Harbor Laboratory.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250,4007-4027.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., and O'Farrell, P.H. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12,1133-1142.
- Okada, N., Shindo-Okada, N., and Nishimura, S. (1977). Isolation of mammalian tRNA^{ASP} and tRNA^{Tyr} by lectin-sepharose affinity column chromatography. *Nucl.Acids Res.* 4,415-423.
- Olexa, S.A. (1977). Characterization of a high molecular weight complex of aminoacyl-tRNA-synthetase in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Temple University, Philadelphia.
- Ozaki, M., Mizushima, S., and Nomura, M. (1969). Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E.coli*. *Nature* 222, 333-339.
- Pearson, R.L., Weiss, J.F., and Kelmers, A.D. (1971). Improved separation of transfer RNA's on chlorotrifluoroethylene-supported reversed phase chromatography columns. *Biochim. Biophys.Acta* 228,770-774.
- Pelham, H.R.B. (1978). Leaky UAG termination codon in tobacco mosaic virus RNA. *Nature* 272,469-471.
- Philipson, L., Anderson, P., Olshevsky, U., Weinberg, R., and Baltimore, D. (1978). Translation of MuLV and MSV RNAs in nuclease-treated reticulocyte extracts: enhancement of the gag-pol polypeptide with yeast suppressor tRNA. *Cell* 13, 189-199.
- Piper, P.W., Wasserstein, M., Engbaek, F., Kaltoft, K., Celis, J.E., Zeuthen, J., Lieberman, S., and Sherman, F. (1976). Nonsense suppressors of *Saccharomyces cerevisiae* can be generated by mutation of the tyrosine tRNA anticodon. *Nature* 262,757-761.
- Piper, P.W., and Wasserstein, M. (1977). Separation of *Saccharomyces cerevisiae* tRNAs on two-dimensional polyacrylamide gels as applied to investigations on the mutational alterations of tRNA's that produce nonsense suppressors. *Europ. J.Biochem.* 80,103-109.
- Pope, W.T., Brown, A., and Reeves, R.H. (1978). The identification of the tRNA substrates for the supK methylase. *Nucl.Acids Res.* 5,1041-1057.
- Reeves, R., and Roth, J.R. (1971). A recessive UGA suppressor. *J.Mol.Biol.* 56,523-533.

- Regenass, U., and Bernhard, H.P. (1979). Rudimentary mutants of *Drosophila melanogaster*. Isolation and characterization of pyrimidine auxotrophic cell lines. Wilhelm Roux'Arch. 187,167-177.
- Rovera, G., Magarian, C., and Borun, T.W.(1978). Resolution of hemoglobin subunits by electrophoresis in acid urea polyacrylamide gels containing Triton X-100. Anal.Biochem. 85,506-518.
- Rubin, G.M. (1974). Three forms of the 5.8-S ribosomal RNA species in *Saccharomyces cerevisiae*. Europ.J.Biochem. 41,197-202.
- Sakai, F., and Takebe, I. (1972). A non-coat protein synthesized in tobacco mesophyll protoplasts infected by tobacco mosaic virus. Mol.gen.Genet. 118,93-96.
- Schubiger, G. (1968). Anlageplan, Determinationszustand und Trans-determinationsleistungen der männlichen Vorderbeinscheibe von *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux'Arch. 160,9-40.
- Schmidt, T. (1980). Lokalisation von transfer RNA Genen durch "in situ" Hybridisierung bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Zürich, Zürich.
- Scott, M.P., Storti, R.V., Pardue, M.L., and Rich, A. (1979). Cell-free protein synthesis in lysates of *Drosophila melanogaster* cells. Biochem. 18,1582-1594.
- Secher, D.S., Cotton, R.G.C., Cowan, N.J., Gesteland, R.F., and Milstein, C. (1979). Structural gene mutants of immunoglobulin heavy chains. In: Nonsense mutations and tRNA suppressors. J.E.Celis, and J.D.Smith, eds. pp.285-299. Academic Press, London.
- Sherman, F., Ono, B., and Stewart, J.W. (1979). Use of the iso-1-cytochrome C system for investigating nonsense mutants and suppressors in yeast. In: Nonsense mutations and tRNA suppressors. J.E.Celis, and J.D.Smith, eds.pp.133-153. Academic Press, London.
- Smith, J.D. (1972). Genetics of transfer RNA. Ann.Rev.Genet. 6, 235-256.
- Smith, J.D. (1979). Suppressor tRNAs in prokaryotes. In: Nonsense mutations and tRNA suppressors. J.E.Celis, and J.D.Smith, eds.pp.109-125.
- Sofer, W.H., and Hatkoff, M.A. (1972). Chemical selection of alcohol dehydrogenase negative mutants in *Drosophila*. Genetics 72,545-549.
- Söll, D., Abelson, J.N., and Schimmel, P.R. (1980) Transfer RNA: Biological Aspects. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sprinzl, M., Grüter, F., Spelzhaus, A., and Gauss, D.H. (1980) Compilation of tRNA sequences. Nucl.Acids Res. 8,rl-r22.

- Stanley, J., and Vassilenko, S. (1978). A different approach to RNA sequencing. *Nature* 274,87-89.
- Steege, D.A., and Söll, D.G. (1979). Suppression. In: Biological regulation and development. Volume I. R.F.Goldberger, ed. pp.433-485. Plenum Press, New York.
- Steffensen, D.M. (1973). Mapping genes for the ribosomal protein of *Drosophila*. *Nature* NB 244,231-234.
- Sturtevant, A.H. (1920). The vermilion gene and gynandromorphism. *Proc.Soc.Exp.Biol.* 17,70
- Telfer, W.H. (1961). The route of entry and localization of blood proteins in the oocytes of saturniid moth. *J.biophys.biochem. Cytol.* 9,747-759.
- Twardzik, D.R., Grell, E.H., and Jacobson, B.K. (1971). Mechanism of suppression in *Drosophila*: A change in tyrosine transfer RNA. *J.Mol.Biol.* 57,231-245.
- Vaslet, C., and Berger, E. (1976). The ribosomes of *Drosophila*: IV. Electrophoretic identity among ribosomal subunit proteins from wild type and mutant *D.melanogaster* and *D.simulans*. *Mol.gen.Genet.* 147,189-194.
- Waterston, R.H., and Brenner, S. (1978). A suppressor mutation in the nematode acting on specific alleles of many genes. *Nature*, 275,715-719.
- Wallace, R.B., Johnson, P.F., Tanaka, S., Schödl, M., Itakura, K., and Abelson, J. (1980). Directed deletion of a yeast transfer RNA sequence. *Science* 209,1396-1400.
- Weber, L, and Berger, E. (1976). Base sequence complexity of the stable RNA species of *Drosophila melanogaster*. *Biochem.* 15, 5511-5519.
- Weiner, A.M., and Weber, K. (1971). Natural readthrough at the UGA terminator signal of Q ϕ coat protein cistron. *Nature* NB 234,206-209.
- Weissenbach, J., Dirheimer, G., Falcoff, R., Sancean, J., and Falcoff, E. (1977). Yeast tRNA^{Leu} (anticodon U-A-G) translate all six leucine codons in extracts from interferon treated cells. *FEBS Letters* 82,71-76.
- White, B.N., Tener, G.M., Holden, J., and Suzuki, D.T. (1973). Activity of a transfer RNA modifying enzyme during the development of *Drosophila* and its relationship to the su(s) locus. *J.Mol.Biol.* 74,635-651.
- Wosnick, M.A., and White, B.N. (1977). A doubtful relationship between tyrosine tRNA and suppression of the vermilion mutant in *Drosophila*. *Nucl.Acids Res.* 4,3919-3930.
- Yarus, M., Knowlton, R., and Soll, L. (1977). Aminoacylation of the ambivalent Su⁺7 amber suppressor tRNA. In: *Nucleic Acid-Protein Interactions*. H.J.Vogel, ed. pp.391-408. Academic Press, New York.

- Yates, J.L., Gette, W.R., Furth, M.E., and Nomura, M. (1977). Effects of ribosomal mutations on the readthrough of a chain termination signal: studies on the synthesis of bacteriophage λ O gene protein in vitro. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 74,689-693.
- Zimmermann, R.A., Garvin, R.T., and Gorini, L. (1971). Alteration of a 30S ribosomal protein accompanying the ram mutation in Escherichia coli. Proc.Natl.Acad.Sci. 68,2263-2267.
- Zimmern, D. (1977). The nucleotide sequence of the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. Cell 11,463-482.
- Züblin, E. (1980). Reinigung und Charakterisierung einer potentiellen Suppressor-Transfer-RNA aus dem Stamm Su(dx) von Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Universität Zürich, Zürich.

CURRICULUM VITAE

Mariann Bienz, von Winterthur (Kanton Zürich), geboren am 21. Dezember 1953 in Winterthur. In Winterthur besuchte ich das Gymnasium und schloss 1972 mit der Matura, Typus B, ab. Im gleichen Jahr immatrikulierte ich mich an der philosophischen Fakultät II der Universität Zürich, studierte vier Jahre Biologie und erwarb 1976 das Diplom mit Hauptfach Zoologie, Nebenfach Molekularbiologie. Seit Herbst 1976 bin ich als Forschungsassistentin am zoologischen Institut der Universität Zürich (ursprünglich bei Prof. I.I.Deak) tätig und führte unter der Leitung von PD Dr. E.Kubli und Prof. P.S.Chen meine Doktorarbeit aus.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Kurse folgender Dozenten: Bachofen, Baker, Batschelet, Baumann, Biegert, Billeter, Birnstiel, Briegel, Brun, Burla, Chen, Christen, Clarkson, Cook, Deak, Dübendorfer, Eller, Eugster, Hohl, Hoyningen, Humbel, Jungen, Jungen-Hauschteck, Kägi, Kubli, Kummer, Mindek, Melli, Nöthiger, Oswald, Rast, Rohweder, Rütter, Sauter, Schaffner, Schmid, Tardent, Wanner, Weber, Wehner, Weissmann, Ziswiler.

